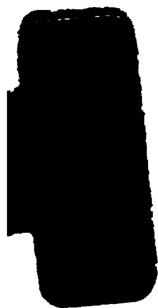








ANNALI
D'IGIENE SPERIMENTALE

PUBBLICATI DAI PROFESSORI

L. ARMANNI (Napoli) — G. BORDONI-UFFREDUZZI (Milano) — P. CANALIS (Genova) — A. CELLI (Roma) — V. DE GIAXA (Napoli) — E. DI MATTEI (Catania) — A. DI VESTEA (PISA) — A. MAGGIORA (Modena) — L. MANFREDI (Palermo) — G. ROSTER (Firenze) — G. SANARELLI (Bologna) — F. SANFELICE (Messina) — A. SERAFINI (Padova) — G. SORMANI (Pavia) — G. ZIINO (Messina)

E DIRETTI DAL

PROF. ANGELO CELLI

(Continuazione degli *Annali dell'Istituto d'Igiene sperimentale dell'Università di Roma*)

VOLUME XIII (NUOVA SERIE) — ANNO 1903

con quattordici tavole litografiche



UNIONE TIPOGRAFICO-EDITRICE TORINESE

MILANO — TORINO — ROMA — NAPOLI

1903

Roma - Tip. Nazionale di G. Bertero e C

INDICE DEL VOLUME XIII

XI DICEMBRE MCMIII

A

ROBERTO KOCH

NEL SUO LX GENETLIACO

DIRETTORE E COLLABORATORI DI QUESTI ANNALI

MANDANO

REVERENTE, AUGURALE OMAGGIO.

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Studi sul vaiuolo

FRANCESCO SANFELICE, professore d'Igiene nella R. Università
e **VITT. EM. MALATO,** medico provinciale

(con la tavola I).

I.

Ricerche epidemiologiche.

Il vaiuolo nella provincia di Cagliari era prima del 1892 endemico, e vi apportava una grande mortalità: infatti nel 1881 vi finirono di tal morbo non meno di 565 individui, e 2014 nel quinquennio 1887-91; mentre nel 1892 vi furono soltanto 22 morti per vaiuolo, nel 1893 uno, nel 1894-97 nessuno.

La scomparsa dell'endemia dal 1892 in poi si potrebbe spiegare quale conseguenza delle estese vaccinazioni in tal periodo eseguite per effetto del nuovo ordinamento sanitario del Regno, e per la generalizzazione dell'uso del vaccino animale.

Alla lunga tregua concessa dal vaiuolo concorse la mancanza di una nuova importazione del contagio, e la pronta distruzione di questo intorno a qualche raro caso in quel periodo manifestatosi.

Verso la metà del novembre 1897 si verificò a Cagliari un caso grave di vaiuolo in una ragazza di 7 anni per contagio acquisito alcuni giorni prima a Tunisi donde l'infetta proveniva.

Di questa ricomparsa del vaiuolo si ebbe denuncia con ritardo, per modo che, mancato dapprima ogni provvedimento profilattico, il contagio si trovò nelle più favorevoli condizioni per diffondersi, e costituire nuovi focolai d'infezione, dando in pochi giorni altri 17 casi con 6 decessi.

Dei provvedimenti allora disposti furono seriamente attuati quelli relativi alle vaccinazioni. D'isolamento degli infetti non si ebbero che le parvenze, e le disinfezioni furono d'efficacia discutibile per difetto di personale e di mezzi.

In un primo tempo, dal novembre 1897 al gennaio 1898, fu applicata con rigore la profilassi specifica nelle scuole, in tutti gli istituti d'educazione e di beneficenza, nell'ospedàle e nel manicomio della città, negli opifici industriali governativi e privati, nelle caserme. *In nessuno di questi locali si verificò allora ed in seguito alcun caso di vaiuolo.*

Nello stesso tempo parte della popolazione dei centri infetti si sottopose alle vaccinazioni, o per paura del male, o per non incorrere in contravvenzioni.

Per tale estensione data alla profilassi specifica, da 27 casi di vaiuolo nel decembre 1897 e 34 nel gennaio 1898, si discese rapidamente a 5 casi nel febbraio, e si restò con 7, 4, 12, 6, 13 casi per mese sino al luglio dello stesso anno.

Per la rapida diminuzione dei casi, e per il successivo andamento tranquillizzante dell'endemia, cessata la paura, cominciarono fin dal febbraio a trascurarsi alquanto, e poscia del tutto, le vaccinazioni, mentre il contagio trovava l'opportunità d'invadere quegli altri centri della città ai quali non s'era esteso l'obbligo delle vaccinazioni.

Ciò spiega come dai 13 casi del luglio 1898 si risalì bruscamente a 32 nell'agosto.

Si riattivò allora l'applicazione della profilassi specifica, ma non a sufficienza, per modo che si ebbero ancora 29, 20, 22 casi al mese sino ai primi del decembre 1898.

A questa data erano stati vaccinati circa 14,000 individui.

Dalla stessa data al febbraio 1899 si ottenne, con uno sforzo energico, la vaccinazione di circa altri 25,000 individui.

In quest'ultimo periodo si ebbero complessivamente 22 casi di vaiuolo distinti come segue: 17 nel decembre con 4 decessi dei quali due individui mai vaccinati, uno in un vaccinato con risultato negativo ed uno in un vaccinato due o tre giorni prima che desse sintomi di vaiuolo; tre casi nel gennaio con due decessi, dei quali uno in un bambino di 4 anni, vaccinato e rivaccinato con risultato negativo, ed uno in un bambino di 5 anni, vaccinato con risultato positivo ad un anno; due casi nel febbraio, seguìti da guarigione, uno dei quali, molto grave, in una ragazza di 8 anni, vaccinata e rivaccinata all'età di 3 anni con risultati negativi, ed

uno in un bambino di 5 anni vaccinato con risultato positivo ad un anno di età.

L'ultimo caso di vaiuolo nell'epidemia a Cagliari si verificò il 22 febbraio 1898.

Dal luglio al novembre del 1898, nel tempo, cioè, in cui l'epidemia s'avviava ad un secondo elevamento, il contagio, ormai diffuso in ogni parte della città, cominciò ad irradiarsi ai comuni della provincia, e, mentre in alcuni fu con prontezza ed energia isolato e distrutto alle prime sue manifestazioni, invece per deplorevoli circostanze si estese latente e in forma epidemica nei comuni di Quartucciu, Mogoro, Villamassargia e Santadi.

TABEL

Numero dei casi e dei morti di vaiuolo constatati nei comuni

Anno e mese nei quali avvenne la constatazione	Cagliari		Quartucciu		Mogoro		Villamassargia		Santadi		San Pantaleo		Senorbi		Quarto S. Elena		Gonnostramatza	
	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti
Novembre 1897.	1	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Dicembre » .	27	6	..	..	..	..	..	..	..	..	1	1	1	..	..	..	..	..
Gennaio 1898.	34	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Febbraio » .	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Marzo » .	9	3	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Aprile » .	4	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Maggio » .	12	2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Giugno » .	6	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Luglio » .	13	5	2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Agosto » .	32	7	2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..
Settembre » .	29	5	4	1	9	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Ottobre » .	20	5	25	7	10	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..
Novembre » .	22	3	25	9	19	..	..	..	..	..	..	..	..	..	2	..	..	..
Dicembre » .	17	5	2	..	38	5	2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Gennaio 1899.	3	2	..	..	25	2	4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..
Febbraio » .	2	..	..	..	..	..	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Marzo » .	..	..	..	..	..	..	18	1	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Aprile » .	..	..	..	..	..	..	31	2	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Maggio » .	..	..	..	..	..	..	4	1	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Giugno » .	..	..	..	..	..	..	..	..	8	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Luglio » .	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Ottobre » .	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Totali . . .	236	50	60	17	101	7	64	4	20	..	1	1	1	..	4	..	1	..

LA A.

della provincia di Cagliari dal novembre 1897 all'ottobre 1899.

Macomer		Villacidro		Borore		Monserrato		Barumini		Setzu		Iglesias		Narcao		Palmas Suergiu		Villarios		Totali	
casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti	casi	morti
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	1
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	29	7
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	34	5
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	5	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	9	3
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	4	1
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	12	2
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	6	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	15	5
1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	36	7
..	..	2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	42	6
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	58	12
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	68	12
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	59	10
..	..	..	..	1	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	35	4
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	7	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	19	1
..	..	..	..	..	..	..	..	2	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	39	2
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	..	10	1
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	9	..
1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	1	..	..	..	4	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	1	..
2	..	2	..	1	..	1	..	2	..	1	..	1	..	2	..	1	..	1	..	502	79

A Quartucciu i primi due casi manifestaronsi nel luglio 1898 in individui contagiati a Cagliari. Seguirono due altri casi nell'agosto, 4 nel settembre con un decesso, 25 nell'ottobre con 7 decessi e 25 nel novembre con 9 decessi. Dal 4 al 16 novembre, nel quale periodo verificaronsi 20 casi ed 8 decessi, fu vaccinata quasi tutta la popolazione. Dal 16 novembre a tutto il dicembre si ebbero soltanto 4 casi di vaiuolo: uno emorragico, seguito da morte, in un bambino nato da 16 giorni da donna, nella quale s'era manifestato gravemente il vaiuolo il giorno prima del parto, e 3, seguiti da guarigione, in due non vaccinati ed in uno il cui stato di vaccinazione era ignoto.

A Mogoro il primo caso di vaiuolo si ebbe il 15 settembre 1898 in una fanciulla dodicenne contagiatasi a Cagliari. A questo ne seguirono altri 100 con 7 decessi.

Dal 1° decembre 1898 al 21 gennaio 1899, nel quale periodo verificaronsi gli ultimi 63 casi e i 7 decessi, fu vaccinata l'intera popolazione.

A Villamassargia il primo caso avvenne ai primi del decembre 1898. Seguirono altri 62 casi dal gennaio ai primi del maggio con 4 decessi. Dal 18 al 30 aprile, nel quale periodo fu vaccinata quasi tutta la popolazione, si ebbero 23 casi con due decessi. L'ultimo caso, seguito da morte, fu di vaiuolo emorragico.

A Santadi il vaiuolo si manifestò alla metà del marzo 1899 nella frazione Nuxis, avente poco più di 200 abitanti, e quivi restò circoscritto. Il contagio vi fu importato da un individuo che pochi giorni prima aveva assistito un vaiuoloso a Villamassargia.

Vi si manifestarono 20 casi, in generale benigni, seguiti da guarigione, dei quali 7 nella prima metà del giugno. Gli abitanti della frazione furono in gran parte vaccinati il 16 dello stesso mese, e dopo non si ebbero che due casi, uno in un vaccinato con risultato negativo, ed uno in un vaccinato da due anni con risultato positivo.

Nei comuni dai quali la denuncia delle manifestazioni di vaiuolo fu data sollecitamente al primo caso o ai singoli casi non connessi fra loro geneticamente, si provvide anco all'isolamento relativo delle famiglie infette ed alle disinfezioni ed in questi comuni il contagio fu arrestato e distrutto nei singoli focolai isolati.

Questo risultato favorevole non devesi a pura casualità; infatti non si trattò di fenomeno isolato, ed invece la diffusione epidemica avvenne soltanto e sempre quando, mancata la denuncia immediata, mancarono l'isolamento degli infetti e le disinfezioni.

Ciò prova che questi provvedimenti, anco se non applicati con rigore, si dimostrano alquanto efficaci, perchè rendono certamente meno numerosi e contatti e veicoli di contagio, e di conseguenza meno numerose le probabilità di nuove infezioni.

L'epidemia nei cinque comuni cessò in coincidenza delle vaccinazioni generali, e quando dovevano ritenersi molti gli individui non ancora immuni al vaiuolo, e non distrutto il contagio negli

ultimi focolai intorno ai quali il corso dell'epidemia s'era bruscamente arrestato.

Questa pertanto si ritiene cessata per influenza diretta delle anzidette vaccinazioni.

Il contagio di vaiuolo nell'epidemia impiegò normalmente lungo tempo prima di propagarsi al di là del primo focolaio e di ogni altro successivo, malgrado la trascuranza d'ogni profilassi pubblica; intere sezioni dei cinque comuni infetti furono risparmiate completamente dal vaiuolo, e questo si propagò da un comune all'altro in generale trasportato direttamente da individui infetti, o restati a contatto immediato con infetti.

Quest'ultima circostanza fu constatata per Cagliari, Quartucciu, Mogoro, Santadi, San Pantaleo, Senorbi, Quarto Sant'Elena (per 4 volte), Gonnostramatza, Villacidro, Barumini, Setzu, Iglesias, Narcao, Palmas Suergiu, Villarios. Ciò avvenne con molta probabilità per Villamassargia e Macomer.

Mentre un trasporto in altri modi non fu accertato che per Monserrato, dove l'infezione manifestossi in un bambino, al quale eransi per ignoranza fatti indossare abiti lasciati da altro bambino morto di vaiuolo a Cagliari.

Ciò dimostra che il *contagio del vaiuolo non è trasportabile, e non attecchisce con quella facilità che ordinariamente si suppone.*

Fra i 14,159 individui costituenti (censimento 1901) la popolazione dei comuni di Mogoro, Narcao, Quartucciu, Santadi e Villamassargia, se ne trovarono 1708, aventi dai 5 agli 80 anni (e certo ve n'erano molti altri ancora sfuggiti all'osservazione) che avevano sofferto il vaiuolo in anteriori epidemie.

Nessuno di costoro ebbe una recidiva, nè se ne ebbero a Cagliari, dove in cifra assoluta erano molti i vaiuolizzati nelle epidemie anzidette.

Ciò conferma che l'*immunità acquisita* per vaiuolo è permanente.

Nel corso dell'epidemia si notò ch'erano risparmiati, o benignamente infetti, alcuni individui, mai vaccinati, appartenenti alla prima e seconda infanzia, i cui genitori durante la stessa epidemia erano stati attaccati dal vaiuolo in forma più o meno grave; ciò starebbe per l'esistenza d'una completa o relativa immunità congenita, non ereditaria.

La morbosità è stata più benigna e, di conseguenza, minore la mortalità in quelli dei cinque comuni che prima dell'ultima epidemia furono più estesamente e gravemente travagliati dal vaiuolo.

Per anteriori epidemie a Mogoro (popolazione 2317) erano vaiuolizzati non meno di 381 individui, a Santadi (popolazione 4093) 824, a Villamassargia (popolazione 1853) non meno di 197. Or nei 101 casi manifestatisi a Mogoro nel 1898 non si ebbero che 7 decessi; nè può dirsi che ciò fosse in rapporto alla poca virulenza del contagio, poichè due casi, uno rapidamente mortale, l'altro seguìto da guarigione dopo due mesi di sospensione tra vita e morte, furono di vaiuolo emorragico.

A Santadi si ebbero 20 casi tutti seguiti da guarigione, e tutti di forma benigna; eppure il contagio originariamente era virulentissimo, provenendo da Villamassargia dove l'ultimo caso, seguìto da morte, fu di vaiuolo emorragico. In quest'ultimo comune si ebbero solo 4 decessi sopra 64 casi.

Invece a Quartucciu, dove i vaiuolizzati prima dell'epidemia erano soltanto poco oltre i cento, sopra una popolazione di 2317 individui, ed a Cagliari dove fra 39,871 individui osservati se ne trovarono vaiuolizzati soli 1497, si ebbero rispettivamente 17 e 50 morti sopra 60 e 236 casi di vaiuolo.

TABEL

Individui dei comuni di Cagliari, Quartucciu, Mogoro, Santadi e

Numero degli individui distinti per età e per sesso			pei quali manca ogni notizia di vaccinazioni anteriori all'epidemia										prima dell'epidemia mai vaccinati ovvero vaccinati od anche rivaccinati con risultato negativo										vaccinati o rivaccinati pochi giorni prima che che dessero segno d'infezione vaiuolosa									
			distinti secondo il decorso del processo vaiuoloso										distinti secondo il decorso del processo vaiuoloso										distinti secondo il decorso del processo vaiuoloso									
Anni di età	Numero di individui per ciascuna età		mite		poco grave		grave		letale		totali		mite		poco grave		grave		letale		totali		mite		poco grave		grave		letale		totali	
	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne
— 1	19	20	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	2	4	1	2	4	5	11	6	18	17	1	..	..	..	..	..	..	..	1	..
+ 1 — 2	18	17	..	..	..	1	..	..	..	..	..	1	5	2	..	3	2	1	8	5	15	11	1	2	1	..	..	..	..	..	2	2
+ 2 — 5	45	55	3	3	..	1	..	1	..	1	3	6	4	8	4	9	4	7	5	12	17	36	2	3	5	..	..	..	2	..	9	3
+ 5 — 7	25	28	..	3	1	..	1	..	..	..	2	3	1	4	3	1	5	3	3	1	12	9	1	2	..	..	..	..	2	..	2	2
+ 7 — 10	24	36	2	1	..	2	..	..	..	..	2	3	5	5	2	3	3	3	..	3	10	14	..	1	1	2	1	..	..	2	2	5
+ 10 — 15	26	25	1	..	2	1	..	..	1	..	4	1	1	3	1	1	7	4	..	..	9	8	..	..	..	..	..	1	..	..	..	1
+ 15 — 20	18	28	..	2	2	1	..	..	..	..	2	3	1	..	..	1	4	4	..	..	5	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
+ 20 — 25	11	15	..	1	..	2	..	1	..	..	..	4	1	..	..	3	..	..	2	..	3	3	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
+ 25 — 30	4	9	..	..	..	..	..	..	..	1	..	1	..	..	..	..	..	1	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
+ 30 — 35	5	10	..	..	..	1	..	..	..	..	..	1	..	..	2	..	..	..	..	1	2	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
+ 35 — 40	3	8	..	..	1	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
+ 40 — 50	9	8	..	..	1	1	..	..	..	..	1	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
+ 50 — 60	5	6	1	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	1	..	..	1	1	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Oltre i 60.	1	3	..	1	..	..	..	..	..	1	..	2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	213	268	7	11	7	10	1	2	1	3	16	26	20	26	13	24	30	28	29	29	92	107	5	8	7	2	1	1	3	2	16	13

…A B.

…illamassargia che soffersero il vaiuolo nell'epidemia 1897–99.

…umero degli individui																																							
prima dell'epidemia vaccinati o rivaccinati con risultato positivo da anni																														prima dell'epidemia vaccinati o rivaccinati con risultato positivo									
																														distinti secondo il decorso del processo vaiuoloso									
— 1		+ 1 — 2		+ 2 — 5		+ 5 — 7		+ 7 — 10		+ 10 — 15		+ 15 — 20		+ 20 — 25		+ 25 — 30		+ 30 — 35		+ 35 — 40		+ 40 — 50		+ 50 — 60		oltre i 60		totali		mite		poco grave		grave		letale		totali	
uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne
..	3	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	3	..	1	..	..	..	..	..	2	..	3
..	3	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	3	..	2	..	1	1	..	..	..	1	3
5	..	3	6	8	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	16	10	11	8	4	1	1	1	..	..	16	10
1	2	1	1	4	4	3	6	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	9	14	4	8	2	4	2	1	1	1	9	14
2	2	..	1	2	..	5	5	1	6	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	10	14	5	7	4	2	1	4	..	1	10	14
2	..	..	..	..	..	2	..	3	3	6	12	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	13	15	7	9	3	2	3	3	..	1	13	15
1	1	..	..	1	..	..	..	..	2	3	5	6	12	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	11	20	8	7	3	7	..	6	..	..	11	20
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	3	3	4	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	8	8	5	4	2	3	1	1	..	..	8	8
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	3	1	1	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	4	7	2	2	1	2	1	2	..	1	4	7
1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	1	2	6	..	..	..	..	..	..	..	..	3	8	2	2	1	2	..	2	..	2	3	8
..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	2	1	4	..	..	..	..	..	..	2	7	1	3	1	2	..	2	..	..	2	7
1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	2	2	5	4	..	..	..	..	8	7	4	5	2	1	1	1	1	..	8	7
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	1	1	..	..	..	2	2	1	..	..	3	5	1	2	1	2	1	..	..	1	3	5
1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	1	1	1	1	..	..	..	..	..	..	1	1
[illegible]	12	5	8	15	9	10	11	4	11	10	18	9	16	7	6	1	7	4	10	3	6	5	6	2	1	..	1	89	122	51	61	24	29	12	23	2	9	89	122

Questi fatti per vie inverse dimostrano l'esistenza di una immunità ereditaria nella prole di genitori vaiuolizzati; ma la gravità delle precedenti epidemie e la loro estensione dicono a qual prezzo, e attraverso a quante vittime si raggiunga tale immunità.

Qualche fatto speciale isolato sta a conferma di questa immunità.

A Nuxis il 12 giugno una giovane d'anni 18, entrata appena in convalescenza di vaiuolo, partoriva un bambino che in seguito non contrasse il contagio, sebbene nutrito dalla madre mentre ancora in costei si verificava la desquamazione dei residui delle pustule vaiuolose. Il bambino non fu vaccinato.

A Cagliari partoriva a termine una signora che all'ottavo mese di gravidanza aveva sofferto il vaiuolo. Il neonato non contrasse l'infezione, quantunque la casa e gli effetti d'uso della famiglia non avessero subite disinfezioni; e, importantissimo a notarsi, vaccinato una prima volta dopo due o tre mesi dalla nascita, e, di proposito, dopo alquanti altri giorni rivaccinato una prima, e poi una seconda volta, sempre con vaccini diversi, preparati da recente, e contemporaneamente sperimentati ottimi su altri individui, ebbe sempre risultati negativi dagli innesti.

Questo secondo fatto dimostrerebbe anco il rapporto immunizzante reciproco fra vaiuolo e vaccino.

E qui giova accennare ad un altro fatto che dimostrerebbe efficace nel feto la vaccinazione positiva eseguita nella madre durante gestazione.

Una signora a Cagliari fu vaccinata con risultato positivo agli ultimi mesi di gravidanza.

Il neonato vaccinato e rivaccinato sei o sette volte con materiali controllati sempre efficaci in altri, ebbe costantemente risultati negativi.

Nei cinque comuni della provincia colpiti dall'epidemia verificaronsi 481 casi di vaiuolo sopra una popolazione di 56,450 individui. Cagliari 45,404, Quartucciu, Mogoro, Villamassargia, Santadi rispettivamente 2530, 2532, 2042, 3941 (1).

Considerando che per 1000 individui comunemente si ritengono 322 d'età non superiore ai 15 anni, 588 fra 15 e 60 anni e 90 oltre i 60, si ha che della popolazione succennata appartenevano alla 1ª età 18,176. 9 individui, alla 2ª 33,192. 6, alla 3ª 5080. 5.

Con questi dati, e comprendendo fra i mai vaccinati i vaccinati, od anco rivaccinati con risultati negativi ed i vaccinati pochi giorni prima che mostrassero segni di vaiuolo, e fra i vaccinati con risultato positivo anco gl'individui con stato di vaccinazione ignoto, si è constatato che i 481 casi di vaiuolo, verificatisi nei cinque comuni durante l'epidemia sopra descritta, vanno distinti come segue:

---

(1) Questi dati sono del censimento 1881.

TABELLA I.

Stato di vaccinazione anteriore nei 481 casi di vaiuolo verificatisi nell'epidemia 1897-99.

ETÀ	Prima dell'epidemia mai vaccinati												Prima dell'epidemia vaccinati con risultato positivo												Osservazioni
	casi						morti						casi						morti						
	cifre assolute			cifre proporzionali a 1000 individui delle rispettive età			cifre assolute			cifre proporzionali a 1000 individui delle rispettive età			cifre assolute			cifre proporzionali a 1000 individui delle rispettive età			cifre assolute			cifre proporzionali a 1000 individui delle rispettive età			
	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	
1ª età . . .	97	108	205	5.33	5.94	11.28	30	29	59	1.65	1.59	3.24	60	73	133	3.30	4.01	7.31	2	6	8	0.11	0.33	0.44	Le cifre proporzionali furono calcolate in base alla popolazione censita nel 1881, poichè i calcoli eseguironsi prima del censimento 1901.
2ª età . . .	11	12	23	0.38	0.36	0.69	2	2	4	0.06	0.06	0.12	44	72	116	1.32	2.17	3.49	1	5	6	0.03	0.15	0.18	
3ª età . . .	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	3	4	0.19	0.59	0.78	..	1	1	»	0.19	0.19	

Su queste cifre si è calcolato che nella 1ª e 2ª età le mortalità furono alle rispettive morbosità nei rapporti di 1 a 3.47 e a 5.75 nei mai vaccinati e di 1 a 16,62 e a 19,33 nei vaccinati con risultato positivo.

Questi rapporti danno la *dimostrazione numerica dell'efficacia delle vaccinazioni.*

Si osserva inoltre che le cifre proporzionali di mortalità e morbosità per vaiuolo nella 1ª età furono molto più elevate che nella 2ª, e nelle due età più nelle donne che negli uomini.

Ciò dimostra una resistenza minore ed una maggiore predisposizione al vaiuolo negli individui della 1ª età e nelle donne della 1ª e 2ª età. Ma bisogna notare che tutti costoro sono per la loro vita casalinga più esposti ai contagi, e specialmente le donne anco perchè a contatto più frequente e più intimo con gl'infetti.

Non pare invece che a tale resistenza e predisposizione abbia avuto influenza lo stato anteriore di vaccinazione; infatti, dalle cifre proporzionali della seguente tabella II, non risultano fra individui della 1ª e 2ª età e fra uomini e donne differenze sensibili nel numero dei vaccinati con risultato positivo.

TABELLA II.

Stato di vaccinazione anteriore all'epidemia 1897-99 in 4272 individui dei comuni di Mogoro, Quartucciu e Villamassargia.

ETÀ	Mai vaccinati						Vaccinati con risultato positivo						Vaccinati con risultato negativo						Osservazioni
	in cifre assolute			in cifre proporzionali a 1000			in cifre assolute			in cifre proporzionali a 1000			in cifre assolute			in cifre proporzionali a 1000			
	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	uomini	donne	totale	
1ª età . . .	176	148	324	174. 95	180. 48	177. 43	570	446	1016	566. 60	543. 90	556. 40	260	226	486	258. 44	275. 60	266. 15	Le cifre proporzionali si riferiscono rispettivamente ad uomini, o donne o individui d'ambo i sessi della 1ª, o della 2ª o delle due età a seconda che trattisi dell'uno o dell'altro o d'ambo i sessi, o dell'una o dell'altra o delle due età.
2ª id. . . .	81	49	130	61. 87	43. 09	53. 14	1085	985	2070	828. 87	866. 31	846. 28	143	103	246	109. 24	90. 58	100. 57	
Due età . .	257	197	454	111. 01	100. 66	106. 27	1655	1431	3086	714. 90	731. 22	722. 37	403	329	732	174. 09	168. 11	171. 34	

Le cifre di questa tabella riassumono con molta esattezza lo stato di vaccinazione, anteriore all'epidemia, per 4272 individui dei comuni di Quartucciu, Mogoro e Villamassargia, cioè per i 3/5 e più della popolazione (7008 abitanti secondo il censimento del 1901) dei tre comuni. Quindi delle stesse cifre le proporzionali avranno un valore abbastanza esatto, anco se riferite all' intera popolazione; pertanto si può dire che 5062 individui, più dei 7/10 di questa (722. 37 $^{0}/_{00}$) erano vaccinati con risultato positivo.

Si è di più constatato che nella popolazione stessa erano restati vaiuolizzati, per anteriori epidemie, non meno di 676 individui; dunque nei tre comuni figuravano immuni al vaiuolo in modo relativo o assoluto, perchè vaccinati con risultato positivo, o vaiuolizzati, non meno di 5738 individui, cioè più degli 8/10 di tutti gli abitanti.

Ciò, dopo la dimostrazione già data dell'efficacia delle vaccinazioni, spiega come, nonostante la virulenza e la diffusività proprie del vaiuolo, l'epidemia nei cinque comuni raggiunse l'acme con molta lentezza, e dopo che, per una serie di circostanze speciali, il contagio erasi presumibilmente sparso e insinuato in ogni luogo.

Che il contagio si trovasse in tali condizioni non è a dubitare; diversamente non si spiegherebbe come, eseguite durante l'acme stessa le vaccinazioni e rivaccinazioni generali, i colpiti in seguito da vaiuolo, nella massa dell'intera popolazione, siano stati quasi esclusivamente fra i pochissimi individui mai vaccinati, o fra coloro che, pur figurando come vaccinati con risultato positivo, forse non avevano subite che pseudovaccinazioni, o vaccinazioni molto attenuate.

Nei cinque comuni infetti si eseguirono durante l'epidemia circa 50,000 vaccinazioni, e senza alcun inconveniente, sebbene si fosse usato materiale di preparazione recente. Ma agl'innesti si procedeva per incisioni tanto sottili e superficiali dell'epidermide da scoprire appena il derma, in modo che i germi infettivi accidentali, restando localizzati agli strati superficiali della cute, non davano mai fenomeni patologici degni d'attenzione, pur esplicandosi nella sua forma tipica il processo di vaccinazione.

In nessuno degli individui così vaccinati si ebbe in seguito manifestazione di vaiuolo, o si ebbe di raro, e quando il processo di vaccinazione non aveva ancora compiuto il suo corso regolare.

2-A

TABEL

Prospetto degl'individui dei comuni di Mogoro, Quartuccia e Villamassargia che non
durata nella provincia di Cagliari

Anni di età	Numero d'individui per ciascuna età — uomini	donne	con stato di vaccinazione ignoto — uomini	donne	mai vaccinati — uomini	donne	vaccinati 0 a 10 con risultato positivo — uomini	donne	negativo — uomini	donne
= 1. . .	63	62	1	2	44	46	7	5	11	9
+ 1 — 2. . .	56	59	4	6	27	24	13	18	12	11
+ 2 — 5. . .	166	145	10	8	54	47	61	56	41	34
+ 5 — 7. . .	239	117	14	17	24	14	136	45	65	41
+ 7 — 10. . .	196	175	25	19	16	10	110	95	45	51
+ 10 — 15. . .	366	337	26	23	11	7	43	67	9	12
+ 15 — 20. . .	213	220	17	20	7	2	4	8	6	5
+ 20 — 25. . .	211	236	19	18	4	5	7	8	9	11
+ 25 — 30. . .	143	160	23	23	9	2	8	1	.	..
+ 30 — 35. . .	172	143	15	17	5	7	9	..	2	2
+ 35 — 40. . .	285	156	29	16	24	17	..	..	..	..
+ 40 — 50. . .	267	192	31	28	16	9	..	..	..	..
+ 50 — 60. . .	189	191	37	39	16	7	..	2	..	..
Oltre i 60. . . .	140	114	39	26	15	4	..	..	..	..
	2706	2307	290	262	272	201	398	305	200	176

Header groups: "Numero degli individui distinti per età e per sesso" (Anni di età; Numero d'individui per ciascuna età); "Numero … allo stato di vaccinazioni o rivaccinazioni" (con stato di vaccinazione ignoto; mai vaccinati; vaccinati — 0 a 10 con risultato positivo / negativo).

LA C.

offersero mai vaiuolo e che furono vaccinati o rivaccinati nell'epidemia di vaiuolo lal novembre 1897 al luglio 1899.

egli individui distinti in rapporto

ubite anteriormente all'epidemia								al risultato delle vaccinazioni e rivaccinazioni subite durante l'epidemia							
rivaccinati da oltre anni								vaccinati o rivaccinati con risultato incerto o ignoto		vaccinati o rivaccinati con risultato					
10 a 30 con risultato				30 a 80 con risultato											
positivo		negativo		positivo		negativo				positivo		negativo			
uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne	uomini	donne		
..	..	..	..	..	..	..	..	3	2	55	53	5	7		
..	..	..	..	..	..	..	..	4	3	43	45	9	11		
..	..	..	..	..	..	..	..	18	9	120	100	28	36		
..	..	..	..	..	..	..	..	9	4	189	85	41	28		
..	..	..	..	..	..	..	..	13	7	137	134	46	34		
200	160	77	68	..	..	..	..	25	22	271	243	70	72		
149	163	30	22	..	..	..	..	15	19	153	141	45	60		
135	168	37	26	..	..	..	..	33	15	136	147	42	74		
90	127	13	7	..	..	..	..	28	19	89	89	26	52		
64	64	9	3	61	47	7	3	29	4	100	98	43	41		
19	17	2	1	205	101	6	4	9	5	248	117	28	34		
15	5	1	..	195	141	9	9	20	26	194	116	53	50		
6	2	..	..	118	131	12	10	13	13	142	122	34	56		
..	1	..	..	76	81	10	2	13	18	95	66	32	30		
678	707	169	127	655	501	44	28	232	166	1972	1556	502	585		

Ciò dimostra che le *vaccinazioni con materiale attivo e fresco, mentre riescono sicuramente efficaci, restano esenti da pericoli, se si eseguono con metodi razionali.*

Con i vaccini conservati più o meno a lungo si hanno invece vaccinazioni in grado diverso attenuate od anco pseudo-vaccinazioni, poichè il germe specifico del vaccino non può sottrarsi alla legge comune dell'attenuazione e della morte nel tempo.

Le *pseudo-vaccinazioni* si hanno con vaccini specificamente inattivi, siano del resto originariamente sterili o non d'altri germi, potendo i germi accidentali intervenire in ogni caso dall'ambiente; però si distinguono dalle vere, come si dirà in seguito, per il decorso e per i caratteri del processo locale che dev'essere seguito con attenzione, se si vogliono evitare errori.

La tabella I offre modo per dimostrare indirettamente che *fra le vaccinazioni positive figurano molte pseudovaccinazioni.*

Dalle cifre proporzionali in essa riportate si ha che nella 2ª età nella quale (veggasi tabella II) lo stato di vaccinazione è più esteso che nella 1ª età, la mortalità e la morbosità per vaiuolo furono rispettivamente di 0. 12 e di 0. 69 nei mai vaccinati e di 0. 18 e 3. 49 nei vaccinati.

Dal confronto di questi valori dovrebbe concludersi che le vaccinazioni conferiscono una minore resistenza ed una maggiore predisposizione al vaiuolo, ciò ch'è assurdo, essendosi dimostrato matematicamente il contrario.

La contradizione cessa riconoscendo appunto che molte vaccinazioni che figurano come positive, non furono che pseudovaccinazioni.

Con ciò implicitamente si dimostra che l'efficacia preventiva delle vaccinazioni pel vaiuolo è maggiore ancora di quanto fu stabilito in cifre.

La dimostrazione di quest'efficacia e dell'esistenza delle pseudovaccinazioni si è dimostrata sperimentalmente, come si dirà in altra parte del presente lavoro.

II.

Ricerche sperimentali sull'infezione vaiuolosa.

Nella epidemia di vaiuolo verificatasi nella provincia di Cagliari si sono praticate sette autopsie, il cui materiale raccolto ha servito per le ricerche istologiche e batteriologiche esposte nel presente lavoro.

La prima autopsia fu praticata in un bambino di un mese, mai vaccinato. Ebbe manifestazione di vaiuolo il 5 gennaio 1898, morì il giorno 13, e ne fu eseguita l'autopsia il giorno 14 gennaio. In questa prima autopsia si trattava di vaiuolo in buona parte confluente.

Nella seconda autopsia si trattava anche di un bambino di 2 anni e mesi 4, vaccinato con risultato negativo nell'aprile 1897. Ebbe manifestazione di vaiuolo il 28 gennaio 1898 (probabilmente questa data si riferisce alla denuncia del caso, poichè deve ritenersi che la malattia siasi manifestata alquanti giorni, o almeno qualche giorno innanzi), morì il 30 gennaio, ed il giorno stesso dopo alcune ore fu eseguita l'autopsia. Anche in questo secondo caso di trattava di vaiuolo in buona parte confluente.

Nella terza autopsia si trattava di una bambina di 7 anni, mai vaccinata. Ebbe manifestazione di vaiuolo il 5 maggio 1898, morì l'11 seguente nelle ore antimeridiane, ed il giorno stesso ne fu eseguita l'autopsia.

Nel quarto caso in cui fu praticata l'autopsia si trattava di una bambina di 10 mesi, mai vaccinata, la quale ebbe manifestazione di vaiuolo il 3 novembre 1898. Morì il 13 novembre 1898, e nel giorno stesso fu eseguita l'autopsia. Si trattava anche in questo, come nei casi precedenti, di vaiuolo confluente.

Nella quinta autopsia si trattava di una bambina di anni 7, vaccinata con risultato negativo nel 1892, rivaccinata il 2 novembre 1898. Il 4 novembre stesso ebbe, contemporaneamente al primo accennarsi delle pustole vacciniche, manifestazione di vaiuolo sotto forma quasi esclusiva di macchie emorragiche specialmente numerose al tronco, per lo più in forma oblunga e non più larghe di 3 a 4 millimetri nel diametro maggiore, con una parte centrale più intensamente colorata ed una parte periferica sfumata, piane, o leggiermente sollevate sulla superficie cutanea. Le macchie emorragiche erano anche manifeste sulle mucose, delle quali alcune erano sanguinanti. Morì nelle prime ore antimeridiane del 16 novembre, e ne fu eseguita l'autopsia dopo poche ore.

Nella sesta autopsia si trattava di un bambino nato il 7 novembre 1898. Ebbe manifestazione di vaiuolo emorragico il 23 dello stesso mese, e morì nelle prime ore antimeridiane del giorno 30 novembre. Ne fu eseguita l'autopsia poche ore dopo la morte. Il padre, di anni 30, vaccinato con risultato positivo nel 1869, ebbe manifestazione di vaiuolo confluente il 14 ottobre 1898, e ne morì il 28 dello stesso mese. La madre, di anni 26, vaccinata con esito positivo nel 1873, ebbe la prima manifestazione di vaiuolo confluente il 5 novembre 1898, e guarì verso la fine dello stesso mese. Il neonato dovette contrarre il vaiuolo dalla madre poco dopo la nascita, e non fu vaccinato principalmente perchè si ritenne che nelle condizioni che lo circondavano non avrebbe potuto, se non fosse stato congenitamente immune, sfuggire appena nato all'attecchimento del contagio.

Nella settima autopsia si trattava di una donna di 58 anni, mai vaccinata. Si ammalò di vaiuolo il 30 aprile 1899, e contemporaneamente alle manifestazioni cutanee del vaiuolo ebbe la comparsa delle pustole vacciniche. Morì il giorno 15 maggio nelle prime ore del mattino. L'autopsia fu praticata alle ore 16. Si trattava in questo caso di vaiuolo con pustole in massima parte confluenti ed alcune con contenuto leggermente emorragico. Le prime quattro autopsie furono eseguite nel cimitero di Cagliari, la quinta

e la sesta nel cimitero di Quartucciu, piccolo comune poco distante da Cagliari, la settima nel cimitero di Villamassargia, comune situato sulla linea ferroviaria Cagliari-Iglesias.

In tutte queste autopsie si ebbe cura di conservare in tubi sterilizzati diversi pezzi di cute presi da diverse regioni del corpo e diversi pezzi di organi per le ricerche batteriologiche, e di fissare, ed indurire gli stessi pezzi in diversi liquidi per le ricerche istologiche.

Dopo avere sottomessi a ripetuti lavaggi in acqua sterile i pezzi di cute ricchi di pustole, o di macchie emorragiche, si aveva la cura di liberare con ferri sterilizzati la cute dal pannicolo adiposo, e di isolare le pustole o le chiazze emorragiche, quando era ciò possibile. Aperte le pustole con forbici sterilizzate, si raccoglieva il contenuto con ansa di platino sterile, e se ne facevano colture piatte, usando l'agar glicerinato. Se si trattava di cute con chiazze emorragiche, si raschiava la cute, là dove si trovava l'emorragia, con bisturi sterilizzato, ed il prodotto della raschiatura si emulsionava ben bene in agar glicerinato per farne colture piatte. Dal centro dei diversi pezzi di organi raccolti, dopo averli sottoposti a ripetuti lavaggi in acqua sterile, si prendevano con pinze e forbici sterilizzate alcuni pezzetti, e si emulsionavano ben bene nell'agar glicerinato, avendo cura di schiacciare il pezzo di organo sulle pareti del tubo, contenente il substrato nutritivo, per mezzo di un bisturi sterilizzato.

Ciò si faceva per le ricerche batteriologiche. Per le inoculazioni del materiale vaiuoloso negli animali da esperimento si seguiva la stessa tecnica, facendo le emulsioni tanto dal contenuto delle pustole e dalle chiazze emorragiche cutanee, quanto dai diversi organi nell'acqua sterile.

Per fissare, ed indurire i pezzi di cute e di organi abbiamo usato ora l'alcool assoluto, ora il sublimato e l'acido acetico, ora il bicromato di potassio sotto la forma di liquido di Müller.

***

Risultati delle indagini batteriologiche.

Dal contenuto delle pustole raccolto nella prima autopsia si isolarono in coltura pura i seguenti microorganismi:

un micrococco avente tutti i caratteri dello stafilococco piogene aureo, il *bacterium coli*, un bacillo pseudodifterico, un bacillo tifosimile, il diplococco lanceolato del Fraenkel.

La presenza del diplococco lanceolato nel contenuto delle pustole fu anche dimostrata dalla inoculazione dello stesso contenuto nel connettivo sottocutaneo dei conigli, che morirono di setticemia salivare.

Dagli organi raccolti in questa prima autopsia per le ricerche batteriologiche s'isolarono il micrococco, riscontrato anche nel contenuto delle pustole, avente tutti i caratteri dello stafilococco piogene aureo, ed il diplococco del Fraenkel. I conigli cui fu inoculata

nel connettivo sottocutaneo la emulsione della milza e del fegato morirono di setticemia salivare dovuta al diplococco lanceolato.

Sulle colture piatte innestate con il contenuto delle pustole raccolte nella seconda autopsia si ebbe lo sviluppo di numerose colonie di un micrococco avente tutti i caratteri dello stafilococco piogene aureo, scarse colonie dello stafilococco piogene albo e scarse colonie di *Bacterium coli.*

Dagli organi raccolti in questa seconda autopsia si ebbe lo sviluppo del solo micrococco avente tutti i caratteri dello stafilococco piogene aureo. Sulle colture piatte innestate con il contenuto delle pustole raccolte nella terza autopsia si osservarono numerose colonie del micrococco avente i caratteri dello stafilococco piogene aureo, qualche colonia di un bacillo pseudodifterico, discreto numero di colonie dello stafilococco piogene albo, qualche colonia di un bacillo tifosimile. Sulle piastre innestate con i succhi degli organi si svilupparono solamente colonie del micrococco avente i caratteri dello stafilococco piogene aureo.

Dal contenuto delle pustole raccolte nella quarta autopsia si ottennero le colture dei seguenti microorganismi: un micrococco simile allo stafilococco piogene albo, un bacillo simile al *bacterium coli*, la sarcina gialla. Sulle piastre innestate con i succhi degli organi si svilupparono solamente colonie del micrococco simile allo stafilococco piogene aureo.

Dalla raschiatura delle chiazze emorragiche, esistenti numerose sulla cute raccolta nella quinta autopsia, s'isolarono in coltura pura il micrococco simile allo stafilococco piogene aureo ed il micrococco simile allo stafilococco piogene albo. Dagli organi (come nelle altre autopsie si fecero colture utilizzando la milza, il fegato ed il rene) s'isolò solamente il micrococco simile allo stafilococco piogene aureo.

Dalle piastre innestate con il prodotto della raschiatura delle chiazze emorragiche esistenti sulla cute raccolta nella sesta autopsia si svilupparono numerose colonie del micrococco simile allo stafilococco piogene aureo, scarse colonie di un micrococco simile allo stafilococco piogene citreo, discreto numero di colonie di un micrococco simile allo stafilococco piogene albo. Dagli organi s'isolò solamente il micrococco simile allo stafilococco piogene aureo.

Qui è da notare che, mentre nelle prime quattro autopsie i pezzi di cute utilizzati per le ricerche batteriologiche provenivano da regioni ove è più facile l'inquinamento con germi estranei, quelli raccolti per le ricerche batteriologiche nella quinta e sesta autopsia

provenivano dal petto ove è molto limitato l'accesso dei microorganismi accidentali.

Sulle piastre innestate col contenuto delle pustole raccolte nella settima autopsia si svilupparono numerose colonie di stafilococco aureo, scarse colonie di stafilococco albo, poche colonie di un bacillo simile al pneumobacillo del Friedländer, pochissime colonie di un bacillo simildifterico.

Sulle piastre innestate col fegato si svilupparono numerose colonie del micrococco simile allo stafilococco piogene aureo, scarse colonie di stafilococco albo, discreto numero di colonie di un bacillo pseudodifterico. Gli stessi microorganismi si svilupparono sulle piastre di agar glicerinato innestate con pezzi di milza. Sulle piastre innestate con pezzi di rene, oltre ai precedenti microorganismi, si sviluppò anche in scarse colonie il bacillo simile al pneumobacillo del Friedländer riscontrato nel contenuto delle pustole.

In conclusione: *nel contenuto delle pustole trovammo costantemente lo stafilococco piogene aureo, e non costantemente lo stafilococco piogene albo, lo stafilococco piogene citreo, il bacterium coli, un bacillo tifo-simile, un bacillo pseudodifterico, un bacillo simile al pneumobacillo di Friedländer ed il diplococco lanceolato. Dagli organi degli individui morti di vaiuolo cinque volte abbiamo isolato in coltura pura lo stafilococco piogene aureo, due volte insieme con questo microorganismo abbiamo trovato il diplococco lanceolato, il bacillo pseudodifterico, il bacillo simile al pneumobacillo di Friedländer, lo stafilococco piogene albo.*

Si noti che solamente nella settima autopsia, fatta nel mese di maggio, e diverse ore dopo la morte, insieme con lo stafilococco piogene aureo riscontrammo negli organi altri microrganismi rinvenuti con l'esame batteriologico nel contenuto delle pustole.

Dei microorganismi che furono trovati insieme con il micrococco piogene aureo nel contenuto delle pustole e negli organi, dimostrarono potere patogeno nei comuni animali da esperimento, come le cavie ed i conigli, solamente il *bacterium coli* ed il diplococco lanceolato. Quest'ultimo micorganismo patogeno, riscontrato nella prima autopsia, deve essere considerato come un germe che insieme con quello del vaiuolo ha contribuito alla morte dell'individuo. Infatti, nei polmoni vi erano le note caratteristiche di una infiammazione al primo stadio.

***

Dello stafilococco piogene aureo riscontrato negli individui morti di vaiuolo si dirà in seguito. Ora interessa riferire i

Risultati delle inoculazioni del materiale vaiuoloso negli animali da esperimento.

Del materiale vaiuoloso raccolto nella *prima autopsia* furono fatte inoculazioni in cavie, conigli, cani e pecore.

Delle due cavie inoculate sottocutaneamente con il contenuto delle pustole emulsionato in acqua sterile, la prima morì dopo 24 ore, la seconda dopo 48 ore. Sulle piastre di agar fatte con la milza e col fegato della prima cavia si svilupparono tutte colonie di *bacterium coli.* Sulle piastre di agar innestate con la milza e col fegato della seconda cavia si svilupparono colonie di stafilococco piogene aureo e colonie di diplococco lanceolato. Due cavie inoculate sottocutaneamente, la prima con la milza e la seconda con il fegato raccolto nella prima autopsia morirono per infezione dovuta al diplococco lanceolato ed allo stafilococco piogene aureo.

Dei tre conigli inoculati sottocute con il contenuto delle pustole del primo caso, il primo morì dopo tre giorni, il secondo dopo quattro ed il terzo dopo cinque giorni.

Dal sangue del cuore di questi tre conigli s'isola in coltura pura solamente il diplococco lanceolato. Dal sito d'inoculazione di tutti e tre i conigli s'isola lo stafilococco piogene aureo, un bacillo tifo-simile ed il *bacterium coli.* Due conigli inoculati sottocute con succo di milza muoiono d'infezione setticoemica dovuta al diplococco del Fraenkel, e della stessa infezione muore il coniglio inoculato con succo di fegato.

Dei tre cani inoculati in vena giugulare con la emulsione in acqua sterile del contenuto delle pustole raccolte nella prima autopsia, il primo in nona giornata dalla inoculazione presentò sulla cute dello addome, sulla regione interna delle cosce, sulle regioni ascellari numerose pustole, le piccole chiaramente ombelicate, le grandi a superficie cupoliforme. Gli altri due cani non presentarono alcuna manifestazione cutanea. Presa la temperatura rettale del primo cane dal giorno in cui comparvero le pustole, si trovò nei giorni successivi leggermente aumentata. Al decimo giorno dalla praticata inoculazione endovenosa si fece l'esame batteriologico delle pustole più grandi, e si riscontrarono sulle piastre di agar numerose colonie di stafilococco aureo e discreto numero di colonie di stafilococco albo. Al quindicesimo giorno dalla praticata inoculazione si mette a nudo la vena giugulare, e con una siringa sterilizzata si aspirano circa due centimetri cubici di sangue, che si utilizzano per una col-

tura piatta in agar glicerinato. Su questa piastra dopo 24 ore di permanenza nella stufa a 37° si riscontrano solamente colonie di stafilococco piogene aureo. Dopo un mese dalla praticata inoculazione l'animale non ebbe più pustole ed apparve del tutto ristabilito. Guarito del tutto l'animale, gli si praticarono per due volte consecutive innesti di vaccino con esito negativo, mentre lo stesso vaccino innestato su cani di controllo attecchì in modo tipico.

Degli otto cani inoculati endovenosamente con le inoculazioni del fegato e della milza, uno solamente, inoculato con la emulsione della milza, morì dopo cinque giorni presentando il seguente reperto anatomo-patologico: chiazze emorragiche della estensione varia fra mezzo ed un centimetro quadrato nella regione interna delle cosce: sulla cute della coscia destra se ne vedevano tre, due sulla cute della coscia sinistra, scarse chiazze emorragiche sulla mucosa labbiale, chiazze emorragiche sulla superficie peritoneale dello intestino tenue e grasso, corrispondenti a chiazze emorragiche della mucosa intestinale, ciò che spiegava il contenuto sanguinolento dello intestino e la notevole enterorragia verificatasi poche ore prima che l'animale morisse; sulla mucosa dell'esofago si notavano piccole chiazze emorragiche del diametro di un millimetro o poco più di un millimetro. Il fegato si presentava congesto ed aumentato di volume. La milza era un po' ingrossata, e mostrava qualche chiazza emorragica sottocapsulare. I reni alla superficie e nello interno presentavano numerose emorragie sotto la forma di chiazze o di punti più o meno estesi. Piccole e grandi chiazze emorragiche con un punto centrale più intensamente colorato si vedevano alla superficie dei polmoni, nettamente limitate dal colorito normale roseo del parenchima polmonare. Anche nella sezione del polmone si vedevano chiazze emorragiche. Chiazze emorragiche esistevano anche alla superficie del cuore.

Appena morto l'animale, furono fatte colture dalle chiazze emorragiche cutanee, dalla milza e dal fegato, seguendo al solito la stessa tecnica. Sulle piastre di agar innestate col prodotto della raschiatura della cute si ottenne lo sviluppo di numerose colonie di stafilococco aureo e scarse colonie di microrganismi accidentali. Sulle piastre innestate con pezzi di fegato e di milza presi dal centro si svilupparono solamente colonie di stafilococco piogene aureo.

Il contenuto delle pustole raccolte in questa prima autopsia fu inoculato per scarificazione sul muso e sulla cute della regione interna delle cosce di tre agnelli. Solamente sulla cute della regione interna della coscia destra di uno di questi agnellini in quarta giornata si videro delle piccole pustole

che dopo pochi giorni scomparvero del tutto. Ad eccezione di questa scarsa manifestazione cutanea non si ebbe ad osservare nulla di anormale in questi tre ovini (1).

Di tutti gli animali inoculati col materiale vaiuoloso raccolto in questa prima autopsia solamente il cane ha presentato lesioni e reperto anatomo-patologico identico a quello che si osserva nel vaiuolo dell'uomo. Su ciò si dovrà ritornare quando si dirà delle lesioni istologiche riscontrate nelle diverse sezioni degli organi. Qui solamente è utile accennare che il vaiuolo è stato riprodotto sperimentalmente nel cane dall'uomo dal Dupuis (2) e da altri, e che in epidemie di vaiuolo dell'uomo i cani sono stati contagiati di vaiuolo dall'uomo, come ha dimostrato il Weiskopf (3).

Anche del materiale vaiuoloso raccolto nella *seconda autopsia* furono fatte inoculazioni in cavie, conigli, cani e pecore.

Delle due cavie inoculate sottocutaneamente, la prima morì dopo tre giorni e la seconda dopo 4 giorni. Alla autopsia ambedue presentavano piccola quantità di pus nel sito d'inoculazione: nessuna alterazione negli organi.

Con l'esame microscopico del pus si constatò in esso la presenza di cocchi piuttosto numerosi e di bacilli tozzi. Con l'esame microscopico dei diversi organi non si constatò la presenza di microrganismi.

Sulle colture piatte in agar fatte dal pus del sito d'inoculazione delle due cavie si svilupparono numerose colonie di stafilococco piogene aureo e scarse colonie di *Bakterium coli.*

Quattro cavie inoculate nel connettivo sottocutaneo con emulsione di milza e di fegato sopravvissero alla inoculazione.

Due conigli inoculati in vena giugulare col contenuto delle pustole morirono dopo 24 ore e quattro inoculati nello stesso modo morirono dopo 48 ore.

Alla sezione di tutti questi conigli si riscontrò forte iniezione del connettivo sottocutaneo, considerevole tumore di milza, fegato alquanto ingrossato e congesto, anse intestinali alquanto iperemiche. Fatte colture dal sangue del cuore e dalla milza di questi conigli si ebbe quattro volte in coltura pura lo stafilococco piogene aureo: due volte insieme con il *bacterium coli.*

I due conigli inoculati in giugulare con emulsione di milza morirono con un reperto quasi identico a quello innanzi descritto, e dal sangue del cuore s'isolò in coltura pura il micrococco aureo.

---

(1) A tal riguardo devono essere citati i seguenti lavori: Freyer, Zeitschrift f. Hygiene, vol. 21. Freyer, ibidem, vol. 23. Copeman, Brit. med. Journal, vol. 1. Layet, Bull de l'Acad. de méd. vol. 34. Voigt, Deutsche Virteljahresschrilt f. all. Gesundheitspflege, vol. 28.

(2) L'Echo Vétér, 1887.

(3) Adam's Wochenschr, 1887.

Dei quattro cani inoculati in vena giugulare col contenuto delle pustole solamente uno ebbe manifestazione di pustole nella cute in decima giornata dalla inoculazione. Le pustole piccole e grandi erano distribuite come nell'altro cane inoculato col contenuto delle pustole raccolte nella prima autopsia. Questo cane presentante le pustole fu dimostrato anche al collega, prof. Carbone, di anatomia patologica. L'esame batteriologico delle pustole diede per risultato lo stafilococco aureo ed altri scarsi microrganismi accidentali. Fatto un salasso e colture col sangue (circa 3 centimetri cubici) si ebbe una coltura pura di stafilococco. In ventesima giornata dalla inoculazione vedendo che la manifestazione cutanea accennava a guarire fu ammazzato, ed immediatamente ne fu fatta la sezione. Negli organi non si riscontrarono lesioni macroscopiche notevoli. Si notava solo un leggiero tumore di milza; nulla di notevole sulle mucose. Le colture fatte dalla milza diedero sviluppo di stafilococco aureo.

Dei cinque cani inoculati con emulsione di milza e di fegato raccolto nella seconda autopsia uno solamente, inoculato in vena giugulare con emulsione di milza, morì in ottava giornata con reperto anatomo-patologico perfettamente simile a quello descritto innanzi. Sulle piastre di agar innestate con la milza e col fegato si svilupparono solamente colonie di micrococco aureo.

Sul muso e sulla cute della regione interna delle cosce di due agnelli si fecero numerose scarificazioni con una lancetta sterilizzata, e poi vi si depose sopra il contenuto delle pustole raccolto in questa seconda autopsia. I due agnellini non soffrirono perfettamente nulla dalla praticata inoculazione.

Con il contenuto delle pustole raccolte nella *terza autopsia* non si poterono fare inoculazioni nelle cavie e nei conigli. Si fecero solamente inoculazioni endovenose nei cani. Due cani ai quali fu inoculato nella vena giugulare il contenuto delle pustole emulsionato in acqua sterile non presentarono alcuna manifestazione patologica. Uno dei tre cani ai quali fu inoculata in vena giugulare la emulsione della milza in acqua sterile morì dopo sette giorni, e presentò alla autopsia manifestazioni emorragiche tanto sulla cute, quanto negli organi. Fatte colture dalla milza, dal fegato e dai reni, si notò lo sviluppo in coltura pura del micrococco aureo.

Il materiale vaiuoloso raccolto nella *quarta autopsia* non fu inoculato che solamente in vena giugulare di cani. Dei quattro cani inoculati in vena giugulare col contenuto delle pustole uno morì in quinta giornata con manifestazioni emorragiche nella cute e negli organi, simili a quelle precedentemente descritte.

Dagli organi di questo cane fu isolato in coltura pura lo stafilococco piogeno aureo. Due cani inoculati in vena giugulare con emulsione in acqua sterile di fegato sopravvissero senza presentare alcuna manifestazione patologica.

Dei due cani inoculati in vena giugulare con emulsione di milza uno morì in ottava giornata con manifestazioni emorragiche. Dagli organi di questo cane fu isolato in coltura pura lo stafilococco piogene aureo.

Col materiale vaiuoloso raccolto nella *quinta autopsia* furono fatte inoculazioni in dieci cani ed in due piccoli maiali.

Sei cani furono inoculati in vena giugulare col prodotto della raschiatura delle chiazze emorragiche emulsionato in acqua sterile.

Di questi sei cani il primo morì in settima giornata, ed alla autopsia presentò chiazze emorragiche cutanee simili a quelle osservate nel bambino. Queste chiazze emorragiche esistenti sulla cute dell'addome e sulla regione interna delle cosce trasparivano dalla parte del connettivo sottocutaneo. Presentava inoltre numerose chiazze emorragiche sulla superficie dell'intestino, nei polmoni, nei reni, nella milza, simili perfettamente a quelle innanzi descritte. Presentava inoltre tumore di fegato e di milza. Spaccate le glandole linfatiche vi si notavano piccoli punti emorragici. Sulle piastre fatte in agar dagli organi di questo cane si sviluppò in coltura pura lo stafilococco piogene aureo.

Il secondo cane inoculato in vena giugulare con il prodotto della raschiatura delle chiazze emorragiche emulsionato in acqua sterile in undicesima giornata dalla inoculazione presentò chiazze emorragiche sulla cute della regione interna delle cosce, sulle quali si formarono nei giorni successivi delle pustole. Dal contenuto di queste pustole si fecero culture, e s'isolarono lo stafilococco piogeno aureo e lo stafilococco piogeno albo. Scomparsa la manifestazione cutanea fu praticato sulla cute addominale di questo cane lo innesto del vaccino che non diede alcun risultato positivo, mentre lo stesso vaccino attecchì in modo tipico sulla cute di un cane normale.

Dopo circa due mesi dalla praticata inoculazione endovenosa, quando l'animale apparentemente sembrava del tutto guarito della malattia sofferta, presentò paralisi degli arti posteriori. Questo fatto fu osservato anche in alcuni cani inoculati con il prodotto vaiuoloso raccolto nella sesta autopsia, e che presentarono la identica manifestazione cutanea.

Il terzo cane inoculato in vena giugulare con il prodotto della raschiatura delle chiazze emorragiche emulsionato in acqua sterile

in undicesima giornata presentò numerose pustole piccole e grandi sulla cute dell'addome senza fondo emorragico.

Fatte le colture dalle pustole, sulle piastre si svilupparono solamente colonie di stafilococco piogene aureo e di stafilococco piogene albo. Guarito l'animale dalla manifestazione cutanea, non presentò più alcun che di anormale.

Il quarto e quinto cane morirono con manifestazioni emorragiche simili a quelle del primo cane.

Dagli organi s'isolò in coltura pura il micrococco aureo. Il sesto cane sopravvisse alla inoculazione senza presentare alcuna lesione.

Dei due cani inoculati con emulsione di milza in vena giugulare uno morì in ottava giornata con manifestazioni emorragiche nella cute e negli organi, l'altro sopravvisse senza presentare alcuna manifestazione patologica. Dagli organi del primo cane si ottenne la coltura pura dello stafilococco aureo.

Il cane inoculato in vena giugulare con emulsione di fegato sopravvisse senza presentare alcuna lesione.

Al decimo cane fu inoculato sotto cute il prodotto della raschiatura delle chiazze emorragiche. Questo cane presentò una piccola bozza nel sito di inoculazione che dopo 12 giorni scomparve senza ulcerare. L'animale non presentò alcuna manifestazione patologica.

I due piccoli maiali furono inoculati in vena giugulare con la emulsione di milza in acqua sterile.

Il primo morì dopo 11 giorni dalla inoculazione, il secondo dopo 13 giorni.

Alla sezione questi due animali non presentarono alcuna lesione che ricordasse quelle osservate nei cani.

Col materiale vaiuoloso raccolto nella *sesta autopsia* furono inoculati quattro cani, due agnelli, due maiali ed una scimmia. A due cani fu inoculato in vena giugulare il prodotto della raschiatura delle chiazze emorragiche. Di questi due cani uno morì in quinta giornata con manifestazioni emorragiche sulla cute e negli organi. Dalle colture fatte dagli organi si isolò lo stafilococco piogene aureo. L'altro dopo tredici giorni dalla praticata inoculazione presentò sulla cute pustole piccole e grandi dalle quali s' isolarono lo stafilococco piogene aureo e lo stafilococco piogene albo. Questo secondo cane, guarito dalla manifestazione cutanea, ebbe paralisi degli arti posteriori.

Dei due cani inoculati per via endovenosa con la emulsione della milza uno morì in settima giornata con manifestazioni emor-

ragiche, l'altro sopravvisse senza presentare alcuna manifestazione patologica. Dagli organi del primo cane si isolò lo stafilococco piogene aureo.

Dei due agnelli uno fu inoculato per scarificazioni sulla cute della regione interna delle cosce col prodotto della raschiatura delle chiazze emorragiche, l'altro fu inoculato in vena giugulare con lo stesso materiale. Il primo in settima giornata presentò piccole pustole in corrispondenza delle praticate scarificazioni che ingrandirono alquanto nei giorni successivi, e scomparvero al quindicesimo giorno dalla praticata inoculazione. Il secondo morì dopo ventun giorno senza presentare alla autopsia nessuna lesione che ricordasse quelle osservate nei cani.

Lo stesso dicasi dei due maiali inoculati con lo stesso materiale in vena giugulare. La scimmia, inoculata anche per via endovenosa, sopravvisse senza presentare alcuna manifestazione patologica.

Col materiale vaiuoloso raccolto nella *settima autopsia* furono inoculati per via endovenosa cinque cani, due col contenuto delle pustole, uno con emulsione della milza, uno con la emulsione del fegato ed uno con la emulsione del rene.

Dei due cani inoculati col contenuto delle pustole, uno sopravvisse senza presentare alcuna manifestazione patologica, l'altro in undicesima giornata presentò pustole sulla cute dell'addome e delle regioni interne delle cosce, dalle quali insieme con lo stafilococco aureo si isolarono altri germi accidentali. Guarito dalle pustole questo cane fu vaccinato senza esito (mentre il cane controllo presentò la lesione cutanea caratteristica del vaccino). Anche questo cane presentò paralisi degli arti posteriori dopo circa due mesi dalla praticata inoculazione endovenosa.

Il cane inoculato per via endovenosa con la emulsione della milza sopravvisse senza presentare alcuna manifestazione patologica. Vaccinato in sedicesima giornata dalla praticata inoculazione endovenosa il vaccino attecchì sulla cute in modo tipico.

Il cane inoculato con la emulsione di fegato sopravvisse senza presentare alcuna manifestazione patologica.

Il cune inoculato con emulsione di rene, in dodicesima giornata presentò sulla cute piccole chiazze emorragiche che nei giorni successivi andarono estendendosi. Su queste comparvero poi delle pustole. L'animale morì in 22ª giornata presentando negli organi scarse manifestazioni emorragiche. Dagli organi si ottenne in coltura pura lo stafilococco piogene aureo.

Da tutto quanto si è innanzi esposto sui risultati delle inoculazioni del materiale vaiuoloso negli animali da esperimento e specialmente nei cani appare chiaro che il microrganismo che più di tutti doveva richia-

mare la nostra attenzione era quel micrococco avente tutti i caratteri dello stafilococco piogene aureo, e che si era riscontrato costantemente non solo negli organi degli individui morti di vaiuolo, ma anche nei cani cui si era inoculato per via endovenosa il materiale vaiuoloso, e che in vita e dopo morte avevano presentato delle manifestazioni patologiche molto simili a quelle, che si riscontrano nel vaiuolo dell'uomo.

***

I *caratteri morfologici e colturali del micrococco aureo riscontrato nel vaiuolo* non differiscono da quelli del micrococco conosciuto in batteriologia col nome di stafilococco piogene aureo. Il confronto è stato stabilito con molte colture di stafilococco piogene aureo isolato dal pus di ascessi e foruncoli, dal muco ozenatoso, da riniti croniche, da numerosi ascessi, prodotti negli animali con inoculazione di saliva, ecc.

Per rispetto al modo di assumere le sostanze coloranti, per rispetto alla morfologia, per rispetto al modo di sviluppo nei comuni substrati di nutrizione liquidi e solidi non si è riscontrata alcuna differenza degna di nota. Differenze notevolissime si sono notate solamente nel potere patogeno, come in seguito vedremo.

Del resto non sarebbe questo il primo esempio di due micrococchi i quali, avendo caratteri morfologici e culturali perfettamente identici, si differenziano per il potere patogeno. Basterebbe a ciò citare l'esempio dello streptococco piogene e dello streptococco della eresipela. Sono due microrganismi che, indifferenziabili per i loro caratteri morfologici e colturali, pure danno luogo a lesioni del tutto diverse.

Inoltre è da considerare che la medesima specie che noi oggi conosciamo col nome di stafilococco piogene aureo, può dar luogo nell'uomo e negli animali a diversi processi patologici, sì da giustificare il concetto di alcuni batteriologi che questo microrganismo, descritto come specie unica, sia rappresentato da diverse varietà, morfologicamente e culturalmente identiche, diverse per il loro potere patogeno.

Il *potere patogeno del micrococco aureo*, ottenuto in coltura pura dal materiale vaiuoloso e dagli organi dei cani inoculati con questo, è stato sperimentato nelle cavie, nei conigli, nei cani, nelle pecore e nei gatti.

Innanzi tutto è da dire che le colture ottenute dal materiale raccolto nelle sette autopsie si sono dimostrate ugualmente patogene.

S'intende che tutte le colture ottenute dalle sette autopsie sono state sperimentate nel loro potere patogeno negli animali innanzi menzionati. Si sono poi fatte numerose inoculazioni in serie, specialmente da cane a cane, per vedere fino a qual punto poteva esaltarsi la virulenza del microrganismo.

Per le inoculazioni delle colture pure si sono utilizzati i germi e non i prodotti solubili, adoperando a questo scopo le patine sviluppatesi sulla superficie dell'agar, raccolte in piccola quantità con ago sterile, ed emulsionate in acqua sterile.

Le cavie inoculate sotto cute con le colture pure hanno presentato un limitato indurimento nel sito d'inoculazione, che dopo alcuni giorni è scomparso.

In nessuna di queste cavie si è veduta la formazione di un vero ascesso come si osserva per la inoculazione dei comuni stafilococchi piogeni.

Alcune di queste cavie inoculate sotto cute sono morte dopo 20-25 giorni dalla inoculazione sottocutanea, ed alla autopsia non si è riscontrata alcuna lesione negli organi. Fatte colture dal fegato si è ottenuto lo sviluppo del micrococco aureo.

Le cavie inoculate in vena con la coltura pura sono morte dopo 24 ore, presentando alla autopsia una considerevole iniezione del connettivo sottocutaneo, iperemia dello intestino tenue, ingrossamento del fegato e della milza, il rene molto iperemico, urine sanguinolenti in vescica, qualche piccola chiazza emorragica alla superficie dei polmoni. Dagli organi e dal sangue del cuore di queste cavie si sono costantemente ottenute colture pure del micrococco aureo.

Tutti i conigli inoculati in giugulare con le colture pure di micrococco aureo, isolato dagli individui morti di vaiuolo, sono morti dopo 24 ore presentando all'autopsia un reperto perfettamente simile a quello innanzi descritto per le cavie. Dal sangue del cuore e dagli organi si sono sempre riottenute le colture.

Le esperienze d'inoculazione sui cani sono state molto più numerose.

Le inoculazioni cutanee fatte dopo aver praticato con una lancetta sterilizzata numerose scarificazioni, così come si fa nella vaccinazione, non diedero alcun risultato nei cani. Alcuni di questi furono uccisi dopo 10, 20, 30 giorni dalla praticata inoculazione, e non fu mai riscontrata alcuna lesione negli organi. Le colture fatte dalla milza e dal fegato non diedero risultato positivo.

Lo stesso dicasi dei cani cui furono praticati innesti sulla cornea, così come ha consigliato il Guarnieri per il vaccino sui conigli. Questi cani non presentarono alcuna manifestazione patologica. Diremo in seguito del reperto istologico e parassitario delle cornee dei cani, inoculate col micrococco aureo.

Alcuni dei cani cui furono fatti innesti cutanei con la cultura pura furono dopo parecchi giorni inoculati in vena giugulare con la stessa coltura, e tutti o morirono con lesioni emorragiche, o presentarono manifestazione cutanea di pustole.

La maggior parte dei cani cui fu inoculata sottocute la coltura del micrococco aureo, presentarono un indurimento limitato al sito d'inoculazione che dopo 7, 10, al massimo 12 giorni scomparve del tutto. Solamente due dei cani inoculati sotto cute morirono il primo dopo 22 giorni, il secondo dopo 12 giorni.

All'autopsia non si riscontrò alcuna lesione che ricordasse quelle dei cani morti in seguito ad inoculazione endovenosa. Sulle piastre di agar, innestate con la milza di questi due cani, si svilupparono scarsissime colonie di micrococco aureo.

Ad alcuni dei cani che avevano superata l'infezione sottocutanea, fu inoculata in vena giugulare la coltura di micrococco aureo, e o morirono con le manifestazioni emorragiche, o presentarono lesioni cutanee. La inoculazione sottocutanea quindi non li aveva resi immuni contro la inoculazione endovenosa. A tre cani fu inoculata in trachea la coltura del micrococco aureo senza alcun risultato positivo. Dopo circa un mese dalla praticata inoculazione questi tre cani furono vaccinati ed il vaccino attecchì in modo tipico.

Dei cani inoculati nella cavità addominale alcuni sono sopravvissuti senza presentare manifestazione cutanea di pustole; altri sono morti, ed alla autopsia non hanno presentato nulla che ricordasse il reperto anatomo-patologico prodotto nei cani con le inoculazioni endovenose.

Ventidue cani sono stati inoculati per via endovenosa con le colture pure di micrococco aureo isolato non solo dagli individui morti di vaiuolo, ma anche dai cani cui si era inoculato in vena giugulare il materiale vaiuoloso, e che erano morti con il reperto anatomo-patologico innanzi descritto.

Sei di questi cani morirono dopo 5, 6, 7, 6, 8, 12 giorni, presentando all'autopsia un reperto anatomo-patologico con molte manifestazioni emorragiche sulla cute, sulle mucose e negli organi simili a quelle descritte innanzi. Specialmente in uno di questi cani con cute interamente sprovvista di pelo si osservarono sulla cute molte chiazze emorragiche simili perfettamente a quelle osservate sulla cute dei bambini morti di vaiuolo emorragico.

Su alcune di queste chiazze emorragiche si notavano piccole pustole. Alcuni di questi cani poche ore prima della morte presentarono emorragie dal naso e dal retto.

Altri undici cani inoculati in vena giugulare con la coltura pura del micrococco aureo morirono presso a poco dopo lo stesso numero di giorni, ma non presentarono alla autopsia un reperto anatomo-patologico così spiccato come nei sei cani precedenti. Le manifestazioni emorragiche erano per lo più limitate ai reni, all'intestino, o ai polmoni, o alla cute.

Tre cani inoculati in giugulare con il micrococco aureo presentarono in 6ª, 7ª giornata chiazze emorragiche sulla cute della regione interna delle cosce.

In 8ª, 9ª giornata comparvero su queste chiazze emorragiche delle pustole che, dapprima piccole, si estesero nei giorni consecutivi tanto da raggiungere la grandezza di una moneta da un centesimo. Uno solo di questi cani morì dopo 25 giorni dalla praticata inoculazione endovenosa, presentando piccole chiazze emorragiche e piccoli focolai necrotici nei reni, leggiero tumore di milza e di fegato e nessuna altra lesione macroscopica. Dal fegato e dalla milza di questo cane s'isolò in coltura pura il micrococco aureo. Gli altri due cani, guariti dalla lesione cutanea, furono vaccinati senza esito positivo. Presentarono paralisi degli arti posteriori. I due ultimi cani della serie ebbero manifestazione pustolosa della cute, dalla quale guarirono senza presentare più alcuna alterazione. Dalle pustole dei cani inoculati in vena giugulare con le colture pure di micrococco aureo si ottennero nelle colture piatte, insieme ad altri microrganismi (come un micrococco bianco, un bacillo tifo-simile, un bacillo tozzo molto simile al *Bakterium coli*, qualche volta bacilli fondenti, qualche volta capsulati), molte colonie del micrococco aureo inoculato, diagnosi che fu confermata con le inoculazioni endovenose in altri cani.

Due gatti inoculati in vena giugulare con la coltura pura del micrococco aureo isolato dai casi di vaiuolo sono morti dopo 18 e 20 giorni senza presentare alla autopsia alcuna lesione che ricordasse quelle osservate nei cani.

Due pecore, cui in vena giugulare furono inoculate in quantità considerevole colture del micrococco aureo isolato dal vaiuolo, non presentarono alcuna manifestazione cutanea, nè, tenute in laboratorio per più di due mesi dalla praticata inoculazione, dimostrarono alcuna alterazione.

Interessante è certamente il fatto che la pecora, come non si è dimostrata suscettibile alla infezione vaiuolosa, inoculata in vena giugulare col materiale raccolto in una delle autopsie, così non si è dimostrata neanche suscettibile alla infezione del micrococco aureo.

Tutti i microrganismi che furono isolati contemporaneamente al micrococco aureo dal contenuto delle pustole e qualche volta dagli organi degli individui morti di vaiuolo, furono inoculati in coltura

pura per la via endovenosa nei cani, per vedere se erano capaci di produrre le manifestazioni anatomo-patologiche ottenute con la inoculazione endovenosa del micrococco aureo. La massima parte di questi microrganismi e specialmente i micrococchi albo e citreo non produssero alcuna manifestazione patologica. Altri come il bacillo simile al *Bakterium coli* ed il bacillo similtifo produssero delle lesioni, che nulla avevano di comune con quelle prodotte dal micrococco aureo. Quindi si può con ragione conchiudere che *di tutti i microrganismi riscontrati nel contenuto delle pustole e qualche volta negli organi degli individui morti di vaiuolo solamente il micrococco avente i caratteri dello stafilococco piogene aureo è capace, se inoculato per via endovenosa nei cani, di produrre lesioni anatomo-patologiche simili a quelle che si riscontrano negli individui morti di vaiuolo.*

***

Ciò non ostante da alcuni si potrebbe obbiettare che questo micrococco non è che un comune stafilococco aureo, che accidentalmente si trova nel contenuto delle pustole e negli organi degli individui morti di vaiuolo, come accidentalmente altri microrganismi.

Certamente i risultati ottenuti dalle inoculazioni endovenose nei cani con le colture pure del micrococco isolato costantemente dalle pustole e dagli organi degli individui morti di vaiuolo avrebbero perduta ogni importanza, se si fossero riprodotte nei cani le stesse lesioni con colture pure di comuni stafilococchi piogeni aurei isolati da processi patologici affatto diversi dal vaiuolo. Di qui la necessità di eseguire una *serie d'inoculazioni endovenose nei cani con comuni stafilococchi piogeni aurei*, e vedere il reperto anatomo-patologico cui davano luogo.

Si sono isolati gli stafilococchi piogeni aurei da vari ascessi dell'uomo, da flemmoni, da vespai, dal muco nasale d'individui affetti da ozena, da piccoli ascessi delle tonsille, dalla congiuntiva dell'uomo normale e patologica, da ascessi prodotti nei conigli e nei cani con inoculazione di saliva umana, o di pus preso direttamente dagli ascessi dell'uomo, dallo ambiente, tenendo esposte in diversi ambienti piastre di agar.

Tutte queste diverse colture di stafilococchi piogeni aurei sono state inoculate in vena giugulare dei cani, seguendo lo stesso metodo esposto innanzi per il micrococco aureo isolato dal vaiuolo.

I cani inoculati in giugulare con questi comuni stafilococchi pio-

geni aurei sono morti dopo 3 o 12 giorni, presentando all'autopsia un reperto anatomo-patologico affatto diverso da quello osservato nei cani morti in seguito ad inoculazione endovenosa del micrococco aureo isolato dal vaiuolo.

In complesso sono stati inoculati trenta cani. Innanzi tutto è da notare che in questi cani non si sono *mai* osservate lesioni cutanee.

Negli organi addominali le lesioni più importanti si sono osservate nei reni, i quali presentavano alla superficie ascessi miliari più o meno numerosi. La sostanza midollare renale si presentava qua e là iperemica. Il fegato si presentava congesto ed alquanto ingrandito. Anche la milza era alquanto ingrandita. Nella mucosa intestinale ordinariamente non si è notato nulla di anormale. Qualche volta si presentava iperemica. Nella cavità toracica solo raramente abbiamo notato qualche chiazza emorragica nei polmoni e qualche volta ascessi.

In conclusione *i reperti anatomo-patologici cui danno luogo i comuni stafilococchi piogeni aurei, se sono inoculati nelle vene dei cani, sono quelli di una setticoemia o piemia, reperti del tutto diversi da quelli notati nei cani inoculati endovenosamente con la coltura di micrococco isolato dagli individui morti di vaiuolo.*

Certamente è da augurarsi che altri continuino le nostre ricerche isolando comuni stafilococchi piogeni aurei da processi patologici dell'uomo diversi dal vaiuolo, e sperimentandone l'azione patogena per via endovenosa nei cani. Se si riuscirà a trovarne uno che dia le stesse lesioni osservate nei cani inoculati con il micrococco aureo isolato dagli individui morti di vaiuolo, si toglierà a questo ogni importanza etiologica; ma se non si riuscirà a trovarne uno che eserciti la stessa azione patogena, si dovrà ammettere che quello isolato dagli individui morti di vaiuolo ha grande importanza nella genesi di questa malattia infettiva.

Risultati delle indagini istologiche.

Il materiale raccolto nelle diverse autopsie di vaiuolo come si è detto innanzi fu fissato in alcool assoluto, in liquido di Müller e in sublimato e acido acetico. I pezzi in parte furono colorati *in toto* con carminio Mayer e litiocarminio, in parte furono colorati sulle sezioni con il miscuglio di saffranina e verde malachite, di saffranina e verde iodo o con ematossilina. Le sezioni colorate col carminio

dopo attaccate sui vetrini porta-oggetti, furono sottomesse alla colorazione del violetto di genziana (liquido di Ehrlich) e come soluzione mordente fu usata o la tintura iodo-iodurata, ovvero la soluzione di acido ossalico al 0. 5 per cento.

Nelle sezioni della *cute degli individui morti di vaiuolo non emorragico* si è potuta seguire la genesi delle vescicole vaiuolose. Al rigonfiamento delle cellule dello strato mucoso al disopra delle estremità del corpo papillare segue la distruzione della maggiore parte delle cellule epiteliali. A questo modo nel massimo sviluppo della pustola vaiuolosa trovasi una cavità traversata da membrane, la quale nel centro arriva fino allo strato corneo, mentre lateralmente è separata da questo dalle cellule epiteliali. Gli spazi compresi fra le membrane o trabecole sono riempiti da numerosi corpuscoli purulenti quando la vescica subisce la fase purulenta. La genesi di queste vescicole fa supporre, come accade in fatti, la localizzazione delle forme parassitarie nello interno delle cellule epiteliali.

Nelle sezioni della *cute degli individui morti di vaiuolo emorragico* alle volte il corpo papillare mostravasi privo di emorragie, e solo ne era disseminato lo strato posto immediatamente al disotto; alle volte le emorragie si ravvisavano in tutti gli strati cutanei e perfino nel tessuto adiposo sottocutaneo.

Nella *mucosa intestinale* le lesioni che più comunemente si riscontrano sono la infiltrazione della mucosa e le emorragie. Spesso nel centro di follicoli intestinali si vedono focolai necrobiotici.

Nel *fegato* alle volte si è osservato rigonfiamento torbido delle cellule epatiche, consecutiva degenerazione adiposa con notevole infiltrazione perivasale. Altre volte non abbiamo notato alterazioni degne di nota, specialmente in alcuni casi di vaiuolo non emorragico.

Nei *reni*, oltre alle degenerazioni parenchimatose, si notano focolai necrobiotici e le emorragie, specialmente dei glomeruli, in guisa che si riscontrano corpuscoli rossi anche al di fuori del glomerulo.

Nella *milza* si è osservato l'ingrossamento considerevole dei follicoli. Nelle *glandole linfatiche* si è osservata la esistenza abbastanza frequente di focolai necrobiotici. Nel polmone sono specialmente da notare le affezioni catarrali dei bronchi sottili e sottilissimi, e le emorragie.

Queste sono le lesioni che più comunemente si sono riscontrate nei tessuti degli individui morti di vaiuolo.

I *tessuti dei cani morti in seguito alla inoculazione endovenosa del materiale vaiuoloso e della coltura pura di micrococco aureo* sono stati fissati e colorati nel medesimo modo come i tessuti degli individui morti di vaiuolo.

La struttura delle pustole sulla *cute* dei cani è perfettamente identica a quella descritta innanzi per le vescicole vaiuolose dell'uomo. Identiche sono pure le lesioni riscontrate negli organi specialmente dei cani che sono morti con le manifestazioni emorragiche. .

Le lesioni che si osservano nell'*intestino* sono la considerevole infiltrazione della mucosa, l'ingrossamento dei follicoli linfatici, alcuni dei quali presentano focolai necrobiotici, e le emorragie. Le emorragie che si vedono a chiazze sulla superficie esterna dello intestino, nelle sezioni trasversali si riconoscono localizzate tra la tunica muscolare e la mucosa. Qua e là nella spessezza della mucosa intestinale si vedono ammassi di corpuscoli rossi. L'epitelio intestinale, là dove le emorragie sono più estese, si presenta sfaldato con infiltrazione considerevolissima.

Le lesioni istologiche del *fegato* consistono nel rigonfiamento torbido delle cellule epatiche, nella loro degenerazione grassa, nella considerevole infiltrazione perivasale e nelle emorragie. Nei capillari sanguigni osservasi un considerevole aumento degli elementi mobili. Le emorragie sono specialmente sottocapsulari. Qualche volta si sono notati scarsi focolai necrobiotici nel parenchima epatico.

Le lesioni osservate nei *reni* dei cani consistono nel rigonfiamento torbido e nella degenerazione grassa delle cellule epiteliali, nella esistenza di focolai necrobiotici, tanto nella sostanza corticale, quanto nella sostanza midollare, nelle emorragie sotto-capsulari e glomerulari. Le emorragie sotto-capsulari si vedono costituite da una raccolta di corpuscoli rossi da cui si irradiano tra gli interstizi correnti di corpuscoli rossi. Così si spiega l'aspetto macroscopico di queste chiazze esistenti alla superficie dei reni, e che presentano una parte centrale più intensamente colorata della parte periferica. Il punto centrale rappresenta il sito ove è avvenuta la rottura del vaso, mentre l'alone meno intensamente colorato è dato dallo spandimento del sangue nelle maglie connettivali. In alcuni cani l'epitelio renale non si presentava punto alterato. Nella milza si osserva ingrossamento dei follicoli ed aumento dei linfociti negli spazi interfollicolari.

Le lesioni che si riscontrano nei *polmoni* sono le affezioni ca-

tarrali dei grossi, medi e piccoli bronchi, la notevole infiltrazione interstiziale e le emorragie.

I *tessuti dei cani morti in seguito ad inoculazione endovenosa dei comuni stafilococchi piogeni aurei* sono stati fissati e colorati nel modo identico dei tessuti dei cani morti in seguito ad inoculazione endovenosa di micrococco aureo isolato dal vaiuolo.

Le lesioni più importanti si osservano nei reni e nel fegato. Nei *reni* si vedono ascessi più o meno estesi con distruzione del parenchima renale. Nel *fegato* si nota la degenerazione grassa delle cellule epatiche, aumento dei linfociti nei capillari, la notevole infiltrazione perivasale.

Il reperto istologico si differenzia quindi nello stesso modo come il reperto anatomo-patologico, da quello notato nei tessuti dei cani inoculati con materiale vaiuoloso o con coltura pura del micrococco aureo isolato dal vainolo.

***

È a tutti nota la importante scoperta fatta nel 1892 dal Guarnieri (1) il quale nelle pustole di vaiuolo e nel vaccino per lo più nello interno delle cellule riscontrò piccoli corpicciuoli a cui diede il significato di parassiti ed il nome di *Cytoryctes variolae*, *Cytoryctes vaccinae*.

Questi corpicciuoli si trovano nel corpo delle cellule epiteliali dentro ad una specie di vacuolo scavato a spese del protoplasma cellulare. Secondo il Guarnieri le regioni della cute umana vaiuolosa colte dall'alterazione si mostrano già a piccolo ingrandimento meno capaci di assorbire le sostanze coloranti, e per questa ragione possono essere più facilmente ritrovate.

I nuclei sono più distanti gli uni dagli altri, vescicolari e nettamente visibili, perchè il più delle volte sono contenuti in un campo chiaro. Evidentemente gli epiteli in questo momento sono aumentati di volume, e contribuiscono così, sollevando gli strati cellulari più periferici, alla formazione delle papule.

Esaminando queste regioni a più forte ingrandimento si osserva che le alterazioni colpiscono più particolarmente il protoplasma cellulare, risparmiando i nuclei, che in questo momento non presentano lesioni apprezzabili. Probabilmente questa lesione ha la sua sede nella porzione periferica del protoplasma degli epiteli, in guisa che non si distingue più il limite tra un elemento e l'altro. Nella porzione del protoplasma più vicino al nucleo si trovano degli spazi chiari che qualche volta raggiungono la grandezza

(1) Archivio per le scienze mediche. Vol. XVI, 1892. Atti dell'XI Congresso medico internazionale. Vol. II, Roma, 1894.

di quasi i due terzi della cellula. In questi spazi chiari, completamenti trasparenti, o riempiti di un detritus finamente granuloso, è contenuto il nucleo, il quale è ordinariamente spinto da un lato. Oltre il nucleo vi si trovano dei corpuscoli cho si colorano col carminio, con l'ematossilina, saffranina, ecc. Questi corpicciuoli sono di forma diversa, ed hanno un volume diverso. Qualche volta raggiungono la grandezza di quasi la metà di un nucleo epiteliale; altre volte sono molto piccoli e comparabili ad un micrococco. Sembra, sempre il secondo Guarnieri, che le forme più voluminose occupino il centro del focolaio patologico, e che le forme più piccole occupino gli elementi cellulari più periferici della zona alterata. Questo fatto farebbe pensare che questi corpuscoli aumentano di volume con il progresso dell'alterazione del corpo mucoso. E questa ipotesi sembra tanto più probabile in quanto che si può fino ad un certo punto riconoscere che il loro volume è ugualmente in rapporto diretto con il grado dell'alterazione cavitaria dell'elemento cellulare.

Questi corpuscoli in queste specie di nicchie, sempre secondo il Guarnieri, sono d'ordinario solitari, ma qualche volta si trovano al numero di due, e più raramente di tre. Sono situati, nel maggior numero dei casi, ad una certa distanza dal nucleo; molto raramente aderiscono al nucleo, ed allora si adattano, deformandosi, alla superficie della membrana nucleare. Molto raramente questi corpuscoli sono annicchiati nel nucleo di cui la membrana presenta un infossamento per dar luogo alla piccola massa che resta sempre sporgente allo esterno della cavità nucleare. Il Guarnieri non è riuscito coi migliori mezzi di tecnica e con le migliori lenti a riconoscere la struttura intima di questi corpuscoli; si mostrano composti di una sostanza omogenea che si colora uniformemenie tanto al centro, quanto alla periferia.

La moltiplicazione di questi corpuscoli avviene per scissione, e per gimnospore. Su questo secondo modo di divisione però l'autore fa numerose riserve. È noto che i medesimi corpicciuoli il Guarnieri vide, e descrisse nello interno delle cellule epiteliali della cornea del coniglio, dopo avervi praticato lo innesto del pus vaccinico.

Nel 1894 il Monti (1) confermò le ricerche del Guarnieri in quanto egli con pezzi di cute e di mucosa laringea e faringea d'individui morti di vaiuolo riprodusse nello epitelio corneale del coniglio i corpicciuoli endocellulari ritenuti dal Guarnieri come parassiti, mentre non gli riuscì di riprodurre simili corpicciuoli irritando la cornea con olio di croton, o con acido osmico. Ottenne inoltre il Monti risultati positivi inoculando sulla cornea dei conigli il midollo delle ossa, i testicoli e i polmoni degli individui morti di vaiuolo: ottenne invece risultati negativi inoculando il sangne del cuore, il rene, il fegato, la milza, ed il cervello degli stessi individui.

Tanto Ruffer e Plimmer (2), quanto Clarke (3), confermarono i risultati del Guarnieri, i due primi con alquanta riserva, perchè nei parassiti non poterono osservare formazione di spore. Anche Pfeiffer (4), v. Sicherer (5), v.

---

(1) Atti dell'XI Congresso medico internazionale. Roma, 1894.
(2) Brit. med. Journal, vol. 1, 1894.
(3) Transactions of the pathological Society of London, vol. XLVI.
(4) Centralblatt f. Bakt., vol. 18, 1895.
(5) Münch. med. Wochenschr., 1895.

Wasielewski (1), Solovtzoff (2) ed altri confermarono le ricerche del Guarnieri. Lo Pfeiffer, nello stesso modo come Ruffer e Plimmer, non ha potuto osservare la divisione dei corpicciuoli per gimnòspore. Altri osservatori invece, come il Massari e Ferroni (3), il Salmon (4) e l'Hückel (5) non ritengono come parassiti le forme descritte dal Guarnieri e dagli altri, e credono che si tratti di prodotti di degenerazione cellulare.

Il Massari ed il Ferroni non credono che sieno parassiti, perchè loro riuscì di riprodurre gli stessi corpicciuoli irritando la cornea del coniglio con olio di croton ed acido osmico. Il Salmon non li considera come sporozoi, perchè la loro grandezza è varia, la loro forma irregolare, perchè mancano di nucleo e di membrana, e presentano forme che accennano alla divisione diretta. Secondo il Salmon questi corpicciuoli sono nuclei di leucociti polinucleari che sono inglobati dalle cellule epiteliali corneali. Ciò dimostrano le reazioni coloranti che danno i corpiciuoli, reazioni identiche a quelle date dai nuclei di leucociti poli-nucleari.

Secondo l'Hückel i corpicciuoli del Guarnieri sono dovuti a speciali degenerazioni che avvengono nel corpo protoplasmatico delle cellule epiteliali corneali. Le ricerche fatte in seguito alla importante scoperta del Guarnieri da quanto innanzi si è esposto appare chiaro che in parte confermano la esistenza di speciali parassiti nella infezione vaiuolosa e vaccinica, in parte tolgono ogni importanza a quella scoperta, ritenendosi che quelle forme descritte come parassiti in queste infezioni non sono altro che prodotti di degenerazione cellulare. È proprio la ripetizione di ciò che si è avverato a proposito dei famosi coccidi del cancro, e che si avvera tuttora a proposito dei blastomiceti.

Come la questione della etiologia parassitaria dei tumori maligni non avrebbe fatto alcun passo se non si fossero trovati dei parassiti che, inoculati nei tessuti, si fossero dimostrati identici a quelli descritti come coccidi, così la questione dei parassiti del vaiuolo e del vaccino non avrebbe progredito, se non si fossero trovati dei germi che inoculati si presentavano perfettamente identici a quelli descritti dal Guarnieri e da altri.

La descrizione data dal Guarnieri dei parassiti che si riscontrano nella cute dei vaiuolosi, e che in gran parte si è riferita innanzi, dispensa dal descrivere minutamente tutte le loro particolarità di struttura.

Nelle forme parassitarie bisogna distinguere le forme giovani, le forme medie e le forme adulte.

Le forme giovani sono piccolissime, rotonde, simili a micro-

---

(1) Centralblatt f. Bakt., vol. 21.
(2) Archives russes de Path., vol. 4.
(3) Riforma medica, 1893.
(4) Annales de l'Institut Pasteur, 1897.
(5) Ziegler's Beiträge, 1898.

cocchi, circondate da alone chiaro. Talvolta vi sono nella stessa cellula due, tre e più forme giovani distanti le une dalle altre, ovvero riunite insieme.

Le forme giovani disposte in questa ultima maniera sono scarsissime, e probabilmente corrispondono alle fasi di moltiplicazione per gimno-spore o a margherita, descritte dal Guarnieri. Non si tratta di fase di moltiplicazione, ma semplicemente di aggruppamento speciale di parassiti giovani. Queste forme giovani si colorano intensamente con le comuni soluzioni coloranti, ed anche nelle sezioni colorate con violetto di genziana, e trattate con una soluzione mordente (tintura iodo-iodurata, acido ossalico) cônservano il colore violetto intensamente (Fig. 1, 3, 4).

Le forme parassitarie medie (Fig. 2) sono un poco più grandi delle precedenti, sempre però di forma rotonda, simili anche a micrococchi, e comunemente si riscontrano nelle colture insieme con quelle di diametro più piccolo, circondate da alone chiaro, ordinariamente solitarie, raramente più di una nello stesso corpo cellulare. Queste forme parassitarie si colorano facilmente, ma un poco meno intensamente delle forme giovani. Trattate con liquido di Ehrlich e con un mordente qualche volta trattengono il colore, e presentano la parte centrale più intensamente colorata della parte periferica. La parte centrale colorata più intensamente in violetto corrisponde per grandezza alle forme parassitarie giovani. Bisogna avere la precauzione nel fare le colorazioni con liquido di Ehrlich a non spingere troppo oltre la decolorazione con alcool assoluto.

Talvolta tanto le forme giovani, quanto le forme medie si presentano nella stessa cellula una ravvicinata all'altra da costituire un 8 in cifra, come se si trattasse di un diplococco. Le forme adulte (Fig. 6 e 7) sono alquanto più grandi fino a raggiungere, come giustamente ha osservato il Guarnieri, un terzo della estensione del nucleo, non sono regolarmente rotonde come le forme giovani e medie, ma per lo più allungate, o di forma irregolare, sono molto meno intensamente colorate delle forme giovani e medie. Sono circondate costantemente da alone il quale spicca non meno che nelle forme giovani e medie.

Con le diverse colorazioni usate queste forme si sono colorate omogeneamente senza presentare alcuna particolarità di struttura. Colorando le sezioni con liquido di Ehrlich, e decolorandole con una soluzione mordente, queste forme parassitarie si decolorano completamente.

Appartengono tutte queste forme descritte al medesimo parassita? La risposta è affermativa per le ragioni che si esporranno in se-

guito, fondate sugli esperimenti d'inoculazione delle colture pure del micrococco aureo isolato dal vaiuolo sulla cornea dei cani.

Mentre nella cute è abbastanza facile la ricerca microscopica dei parassiti endocellulari, negli altri tessuti questa ricerca diventa abbastanza difficile, ed esige una conoscenza esatta delle forme parassitarie, perchè non si confondano con residui nucleari inglobati dagli elementi linfoidi.

Nelle glandole linfatiche (Fig. 5) i parassiti sono meno scarsi che nella milza, nel fegato, nei reni e nei polmoni. Sulle forme adulte predominano le forme giovani e quelle medie. Si possono facilmente distinguere dai residui nucleari, perchè questi hanno forma irregolare, e non sono circondati dall'alone chiaro. Nella milza si riscontrano i parassiti a preferenza negli elementi linfoidi dei cordoni follicolari, raramente nello interno degli elementi dei follicoli. Nello intestino si riscontrano nello interno degli elementi d'infiltrazione, e non se ne sono veduti nello interno delle cellule epiteliali. Lo stesso dicasi per il fegato ed il rene. In questi organi i parassiti non stanno nello interno delle cellule epatiche o renali, ma nello interno degli elementi mobili, ed è meno difficile ritrovarli là dove questi sono raggruppati. Lo stesso dicasi per il polmone.

Le forme parassitarie che si osservano in questi organi appartengono sempre a quelle giovani e medie.

Dallo esame microscopico di tutte le sezioni degli organi degli individui morti di vaiuolo si vede come la distribuzione dei parassiti negli organi non è uguale e costante. Con ciò si spiegano i risultati in parte positivi, in parte negativi ottenuti dal Monti. Neanche rapporto costante si è notato tra la importanza della lesione degli organi ed il numero delle forme parassitarie. La scarsezza dei parassiti negli organi degli individui morti di vaiuolo spiega la ragione per cui bisogna fare da uno stesso organo colture con più pezzi, e non tanto piccoli, perchè riescano positive.

Nella cute dei cani, morti in seguito ad inoculazione endovenosa di materiale vaiuoloso o di colture pure di micrococco aureo isolato dagli individui morti di vaiuolo, si osservano nello interno delle cellule malpighiane le stesse forme parassitarie descritte nella cute umana (Fig. 8). Avendo le lesioni cutanee dei cani un decorso alquanto più rapido di quelle dell'uomo, sono più numerose le forme parassitarie giovani e medie, meno numerose le forme adulte. Le forme giovani e medie sono perfettamente simili a quelle descritte nell'uomo, e si comportano verso le sostanze coloranti in modo perfettamente identico.

Negli organi dei cani i parassiti hanno la medesima distribuzione che negli organi dell'uomo. Negli organi dei cani sono anche meno scarse le forme giovani e medie, più scarse le forme adulte. Le forme parassitarie si trovano sempre negli elementi linfoidi (Fig. 9 a 14). Quelle giovani, intensamente colorate, sono solitarie, o in più nel corpo protoplasmatico dei linfociti, sempre circondate dall'alone chiaro. Spesso di queste forme se ne vedono ad 8 in cifra perfettamente simili a diplococchi. È la forma che segna il modo di moltiplicazione dei parassiti. Alcune delle forme parassitarie medie si presentano oblunghe e con un cenno di strozzatura nel mezzo, accenno della fase di moltiplicazione per scissione. *Quindi nei tessuti dei cani inoculati con colture pure di micrococco aureo isolato dal vaiuolo si riproducono quelle stesse forme endocellulari osservate nei tessuti degli individui morti di vaiuolo e dei cani morti in seguito ad inoculazione endovenosa di materiale vaiuoloso. Dopo un tale reperto non rimane più dubbio sulla vera natura delle forme endocellulari trovate dal Guarnieri.*

Le stesse forme parassitarie si sono riprodotte nello interno delle cellule epiteliali corneali dei cani, dopo aver praticate scarificazioni multiple con la coltura pura di micrococchi aurei (Fig. 21).

Sulla cornea dei cani lo innesto del micrococco aureo non dà quella lesione tipica che si osserva nella cornea dei conigli dopo lo innesto del vaccino, e che è stata così ben descritta dal Guarnieri. Ciò non ostante, se dopo 48 o 72 ore si uccidono gli animali, e con i soliti metodi di fissazione e di colorazione si esaminano le cellule epiteliali, in alcune di queste si vedono forme endocellulari piccole o medie meno scarse, più le adulte, simili perfettamente a quelle descritte innanzi negli individui morti di vaiuolo e nei cani, e simili a quelle che si osservano nelle cellule epiteliali della cornea dopo lo innesto del pus vaccinico. Le forme piccole e medie nelle sezioni colorate con violetto di genziana (liquido di Ehrlich), e trattate con una soluzione mordente, trattengono il colore violetto.

Scarsissime forme parassitarie, perfettamente simili alle precedenti, si vedono nello interno delle cellule epiteliali della cornea dei cani, e meno scarse nello interno dei corpuscoli di pus se s'innesta sulla cornea, dopo aver praticato delle scarificazioni, uno stafilococco piogene aureo comune (nel caso speciale è stata inoculata una coltura di stafilococco piogene aureo poco virulento, isolato da un caso di rinite) (Fig. 23 a 27).

Le cornee dei cani su cui sono state inoculate le colture pure di stafilococco piogene aureo comune sono state escisse dopo 24 e 48 ore.

Resta ora a spiegare come è che i parassiti endocellulari si presentano di forma diversa. Le forme giovani, piccole, sono quelle penetrate da più breve tempo nel protoplasma degli elementi cellulari, tanto vero che si presentano perfettamente simili alle forme extracellulari, tanto nei tessuti degli individui morti di vaiuolo, quanto nei tessuti dei cani. Le forme medie sono quelle che hanno soggiornato negli elementi cellulari un tempo maggiore; le forme adulte sono quelle che vi dimorano da tempo ancora più lungo, e mostrano segni evidenti d'involuzione. Per comodità di descrizione le forme parassitarie sono state distinte nei tre gruppi di forme giovani, medie ed adulte; ma tra questi tre gruppi non esiste una demarcazione netta, potendosi vedere negli stessi preparati tutte le fasi di passaggio dalla forma giovane alla forma media, e da questa alla forma adulta.

I parassiti adunque, restando a lungo nello interno degli elementi cellulari, vanno soggetti a processi di involuzione, che si dimostrano con la perdita della forma tipica normale. Del resto, come è noto, altri parassiti, stando a lungo nello interno degli elementi cellulari, subiscono fasi d'involuzione.

III.

Ricerche sperimentali sull'infezione vaccinica.

Uno studio sperimentale sulla infezione vaiuolosa non può farsi indipendentemente da uno studio sperimentale sulla infezione vaccinica.

Nei cani si è praticata la vaccinazione sulla cute dello addome, priva di peli. Con una lancetta sterilizzata si sono fatte scarificazioni, e poi vi si è deposto su il pus vaccinico. Dopo due a tre giorni dal praticato innesto si nota considerevole arrossimento in vicinanza delle scarificazioni, con consecutivo sollevamento della cute. In quinta, sesta e settima giornata cominciano a vedersi le pustole sulla cute sollevata. Dopo venti, venticinque giorni la lesione guarisce. Se questi cani che hanno superata la infezione vaccinica, si rivaccinano sulla cute dopo che è guarita la lesione cutanea, o non presentano nulla, o presentano in corrispondenza delle scarificazioni delle piccole e scarse pustole che nulla hanno a che fare con la manifestazione cutanea tipica della infezione vaccinica. Mentre lo innesto cutaneo dei parassiti del vaccino immunizza i

cani contro una seconda infezione vaccinica, non li immunizza se gli stessi parassiti sono inoculati nella cavità addominale o direttamente nelle vene. Infatti, tutti i cani che sono stati inoculati in addome, o in vena giugulare con discreta quantità di vaccino, dopo 10, 12, 14, 16 e più giorni sono stati innestati nella cute col vaccino, e tutti hanno avuto la infezione vaccinica cutanea. Lo stesso deve dirsi per le inoculazioni sottocutanee del vaccino.

Tutti i cani che sono stati inoculati nel connettivo sottocutaneo col vaccino (in tutte queste inoculazioni il comune vaccino è stato sempre diluito con un po' d'acqua sterile), hanno presentato un ascesso più o meno circoscritto che o ha ulcerato, o è scomparso dopo alcuni giorni senza ulcerare. Questi cani, guariti dalla lesione verificatasi nel sito d'inoculazione, sono stati innestati col vaccino sulla cute dell'addome. Ebbene, in tutti costantemente ha attecchito in modo tipico.

Oltre che nei cani, il vaccino è stato inoculato a conigli e pecore, ad un vitello, a gatti, ad una scimmia.

I conigli sono stati inoculati sulle cornee, così come consiglia il Guarnieri, e sulla cute.

Sulle cornee costantemente si è avuto risultato positivo; non così sulla cute. Sulle cornee dei conigli, come giustamente osserva il Guarnieri nel suo lavoro innanzi citato, dopo 24-30 ore dalla praticata inoculazione, si osserva, là dove fu praticato l'innesto, un ispessimento dello strato epiteliale che apparisce un poco sollevato. Questo ispessimento si distende attorno al punto d'inoculazione, ora circolarmente, ora in maniera più o meno irregolare per 2 o 3 millimetri al più. Dopo 60-70 ore l'ispessimento epiteliale aumenta, e nello stesso tempo a qualche distanza dal punto d'inoculazione si vedono delle piccole elevazioni epiteliali molto trasparenti, disseminate in una maniera irregolare. Poi si forma un'ulcerazione sullo ispessimento epiteliale, e la cornea diventa opaca. Per le ricerche istologiche le cornee sono state escisse dopo 48-72 ore.

Quattro agnelli sono stati vaccinati sulla cute. In questi animali la manifestazione cutanea dell'infezione vaccinica non è così tipica come nei cani. Dopo 24 a 48 ore si osserva leggiero arrossimento in vicinanza delle praticate scarificazioni; poi si osserva leggiero sollevamento della cute: in quinta o sesta giornata si notano delle piccole pustole. Dopo 16-20 giorni la lesione cutanea guarisce. Questa lesione, prodotta dal vaccino, non differisce punto dalla lesione cutanea che si produce con le colture pure dei comuni stafilococchi piogeni che quasi costantemente si riscontrano nei comuni vaccini.

Sulla cute del vitello, innestata con vaccino, si sono notate in sesta giornata pustole più grandi che non nelle pecore. L'animale fu ucciso in ottava giornata, e dalle pustole e dagli organi si fecero colture il cui risultato sarà in seguito esposto.

Il vaccino innestato sulla cute dei gatti, grandi e piccoli, non ha mai attecchito. Lo stesso risultato si è avuto innestando ripetute volte il vaccino sulla cute di una scimmia.

Dopo aver veduto che *nei cani il vaccino attecchisce in modo tipico*, si è voluto vedere se i parassiti del vaccino si trovavano solamente nel sito ove erano stati innestati, oppure anche negli organi interni. In una parola si è voluto vedere se la vaccinazione è un processo infettivo locale, o un processo infettivo generale. A questo scopo si sono uccisi i cani dopo diversi giorni dalla praticata vaccinazione cutanea, si sono raccolte le glandole linfatiche, la milza, il fegato, si sono triturati questi organi minutamente, si sono mescolati a parti uguali con un miscuglio d'acqua e glicerina, ed immediatamente si sono inoculati per scarificazione sulla cute dei cani.

Per quante inoculazioni si sieno fatte, non si è avuto alcun esito positivo. Quindi bisogna conchiudere che *i parassiti del vaccino si riscontrano solamente nel sito ove si sono innestati. La vaccinazione quindi è un processo infettivo locale, e non generale.* Con gli organi del vitello vaccinato si sono ripetuti gli esperimenti nei cani. In pochi di questi non si è veduta la manifestazione tipica della infezione vaccinica; ma dopo alcuni giorni sono comparse sulle praticate scarificazioni delle piccole pustole che poi nei giorni successivi sono scomparse. Questa manifestazione cutanea, come vedremo, è dovuta ai comuni stafilococchi piogeni che frequentemente si riscontrano negli organi degli animali vaccinati.

* * *

Prima di parlare dei microrganismi riscontrati negli organi degli animali vaccinati, è necessario dire qualche cosa dei *microrganismi che si riscontrano nel vaccino*.

Le numerose ricerche fatte intorno a questo argomento da Quist (1), Voigt (2), Tenholt (3), Pfeiffer (4), Maljean (5), Land-

(1) Petersburger med. Wochenschr., 1883.
(2) Deutsche med. Wochenschr., 1885.
(3) Correspondenzblatt der allgemein ärtlizchen Vereins von Tübingen, 1887.
(4) Zeitschrift f. Hygiene III.
(5) Gazette hebdomadaire, 1893.

mann (1), Lemoine (2), Deelemann (3), Frosch (4), Paul (5), Sacquepée (6), Chalybäus (7), Kirchner (8), Folli (9), Klein (10), Gorini (11), Abba (12) ed altri dimostrano la presenza nel vaccino di comuni microrganismi piogeni, e di microrganismi saprofiti.

Dalla maggior parte degli autori innanzi citati furono trovati frequentemente gli stafilococchi piogeni come l'aureo, l'albo, il citreo, il cereo-albo, lo streptococco della eresipela, streptococchi non bene identificati, bacilli tifosimili, *bacterium coli*, bacilli pseudodifterici, sarcine, streptothrix, blastomiceti, ecc. Il Deelemann ha trovato gli stafilococchi aurei in 74. 3 su cento vaccini esaminati, gli stafilococchi bianchi in 60 su cento vaccini esaminati. *Col tempo questi germi scompariscono.* Infatti il Deelemann riferisce nel suo lavoro che campioni di vaccino di 118 e 124 giorni non contenevano più stafilococchi, ed un solo campione di 163 giorni conteneva pochi stafilococchi. Mantenendosi il vaccino attivo fino alla fine del 5° mese dalla raccolta, il Deelemann consiglia l'uso della linfa non prima di 2 mesi e non dopo il 5° mese.

I microrganismi che più costantemente e più frequentemente abbiamo riscontrato nei diversi campioni di vaccino, pervenutici da diversi istituti vaccinogeni, sono stati gli stafilococchi, e s'intende facilmente, dopo i risultati esposti intorno alle ricerche fatte sul vaiuolo, come specialmente questi microrganismi meritavano la nostra attenzione.

Fra gli stafilococchi quello che abbiamo trovato più frequentemente è stato lo stafilococco piogene aureo; in secondo luogo lo stafilococco piogeno albo: meno frequentemente abbiamo riscontrato nel vaccino lo stafilococco piogene citreo. Oltre gli stafilococchi abbiamo isolato, non così frequentemente come gli stafilococchi, gli allri microrganismi riscontrati pure dagli autori innanzi citati, e che per il nostro lavoro non avevano speciale interesse.

---

(1) Hygien. Rundschau, 1895.
(2) La Semaine médicale, 1897.
(3) Arbeiten aus dem Gesundheitsamte, vol. XIV.
(4) Bericht ueber die Thätigkeit der Commission zur Prufung der Impfstofffrage. Berlin.
(5) Das oesterreichisches Sanitätwesen, n. 43.
(6) Etudes sur la flore bactérienne du vaccin, tesi 1896.
(7) Jahresbericht. d. Ges. f. Natur-und Heilkunde zu Dresden, 1896–97.
(8) Zeitschrift f. Hygiene, vol. 24.
(9) Riforma medica, n. 257.
(10) 26th Annual Report of the Government Board, pag. 267.
(11) Lavori dei laboratori della sanità pubblica, 1889.
(12) Rivista d'igiene, 1899.

Abbiamo fatte numerose inoculazioni con i due stafilococchi piogeni più comunemente riscontrati nel vaccino, lo stafilococco piogene aureo e lo stafilococco piogene albo, nei conigli, nelle pecore e nei cani.

I conigli sono stati inoculati sulle cornee, nel connettivo sottocutaneo, per via endovenosa.

Facendo ripetute scarificazioni sulle cornee dei conigli, ed inoculando poi le colture di stafilococchi isolati dal vaccino, riesce di vedere nelle sezioni delle cornee escisse dopo 24-48 ore, forme parassitarie endocellulari scarse, ma perfettamente simili a quelle che si osservano nelle cornee innestate col vaccino. Un simile fatto è stato anche osservato dal Gorini, e riferito nel lavoro innanzi citato.

Le stesse forme endocellulari, sempre però in numero scarso, e mai così numerose come per il vaccino, si vedono sottoponendo ad irritazione con sostanze chimiche le cornee dei conigli, così come hanno fatto il Massari ed il Ferroni. In questo caso si tratta dei comuni micrococchi esistenti sulla congiuntiva, che, lesa la integrità dell'epitelio corneale, penetrano nello interno delle cellule epiteliali e simulano i corpicciuoli del vaccino.

Inoculati nel connettivo sottocutaneo dei conigli gli stafilococchi isolati dal vaccino alle volte non hanno prodotto nulla, alle volte hanno prodotto ascessi.

Inoculati poi per via endovenosa ordinariamente hanno prodotto la morte per setticoemia, o pioemia.

Le pecore sono state inoculate per scarificazione sulla cute della regione interna delle cosce, ed alcune volte hanno presentato una lesione cutanea perfettamente identica a quella ottenuta col vaccino.

Nei cani le colture di stafilococchi sono state inoculate per scarificazione sulla cute, nel connettivo sottocutaneo, per via endovenosa.

Sulla cute hanno prodotto alle volte una lesione affatto diversa da quella del vaccino. Dopo 2 o 3 giorni in corrispondenza delle scarificazioni fatte si vedevano delle piccole pustole che poi scomparivano nei giorni consecutivi. Quindi questa lesione aveva una durata più breve che non quella prodotta dal vaccino.

Inoculati nel connettivo sottocutaneo o non hanno prodotto nulla, o hanno prodotto ascessi più o meno estesi. Inoculati per via endovenosa o non hanno prodotto nulla, o hanno ucciso gli animali per setticoemia, o per pioemia.

I cani inoculati per scarificazione sulla cute, e che hanno presentata la lesione pustolosa diversa da quella del vaccino, quando

erano guariti sono stati vaccinati, ed in tutti il vaccino ha attecchito.

Anche sulla cute umana si sono fatti ripetuti innesti con le colture pure di stafilococchi ottenuti dal vaccino, ed alle volte si è prodotta una lesione che fatta vedere a diversi medici, i quali avevano praticate centinaia e centinaia di vaccinazioni, fu da questi giudicata come vaccinazione positiva.

È a questo modo che si possono spiegare i casi di vaiuolo in individui vaccinati da tempo relativamente breve, ovvero rivaccinazioni positive in individui vaccinati con esito positivo da tempo brevissimo. Ed è a questo modo che possiamo spiegarci come alcuni osservatori come ad esempio il Roger (1) videro ammalarsi di vaiuolo persone che poco tempo prima erano state vaccinate con esito positivo. In tali casi trattavasi di *pseudovaccinazioni.*

In conclusione si può dire che *con le colture dei micrococchi isolati dal vaccino non si è riprodotta la lesione cutanea che si osserva con lo innesto del vaccino, e tanto meno si è ottenuta la immunizzazione contro il vaccino. Quindi deve conchiudersi che il parassita del vaccino non si coltiva artificialmente.*

Alcuni dei cani vaccinati sulla cute sono stati uccisi dopo che la lesione cutanea era completamente guarita e dalla milza e dal fegato sono state fatte colture in agar glicerinato per vedere se vi erano microrganismi. Nel maggior numero dei casi si è isolato lo stafilococco aureo e lo stafilococco albo; nel minor numero dei casi si è isolato solamente lo stafilococco piogene albo.

Anche dagli organi del vitello ucciso dopo alcuni giorni dalla praticata vaccinazione si sono fatte colture, e si sono isolati in cultura pura lo stafilococco piogene aureo e lo stafilococco piogene albo.

Dalla lesione cutanea dei cani e del vitello vaccinati, dopo accurato lavaggio furono anche fatte colture, e si ottennero anche colture dei due stafilococchi insieme con altri microrganismi accidentali. Dalla lesione cutanea degli uomini vaccinati anche si fecero colture, e si isolarono anche i due detti stafilococchi piogeni. In alcuni casi questi due stafilococchi erano dotati di forte potere patogeno.

Le esperienze innanzi riferite sul potere patogeno dei microrganismi che si riscontrano nel vaccino, dimostrano quanto ancora primitivo sia il metodo col quale si raccoglie, e che non basta la

---

(1) Comptes rendus de la Société de Biologie, N. 24, p. 647.

conservazione in glicerina per ottenerlo puro come alcuni vogliono tuttora ammettere.

Ad alcuni cani che avevano superata la vaccinazione cutanea, dopo 20, 24, 25, 30 e più giorni è stato inoculato in giugulare il contennto delle pustole d'individui morti di vaiuolo. Tutti questi cani non hanno presentato alcuna manifestazione cutanea, ed hanno superata la infezione. Ad altri cani vaccinati sulla cute, dopo lo stesso numero di giorni, è stata inoculata in giugulare la coltura del micrococco aureo isolato dal vaiuolo. Neanche questi cani hanno presentata alcuna manifestazione patologica. *Come esiste un rapporto fra vaccino e materiale vaiuoloso, esiste anche fra vaccino e coltura di micrococco aureo isolato dagli individui morti di vaiuolo.* La importanza di questo fatto non può sfuggire ad alcuno. Mentre immunizza contro il vaiuolo lo innesto cutaneo del vaccino, non immunizza lo innestò sottocutaneo, nello stesso modo come lo innesto sottocutaneo del vaccino non immunizza contro le innesto cutaneo del vaccino.

A dimostrare questo, diversi cani, inoculati sottocutaneamente col vaccino, furono dopo 20, 30, 40 giorni inoculati in vena giugulare con colture di micrococco aureo, e tutti o morirono, o presentarono lesioni cutanee.

Neanche inoculato per via endovenosa il vaccino è capace di immunizzare i cani contro le inoculazioni endovenose del contenuto delle pustole degli individui morti di vaiuolo, o delle colture del micrococco aureo.

Mentre la lesione prodotta dallo innesto cutaneo del vaccino è capace d'immunizzare i cani contro la inoculazione endovenosa del materiale vaiuoloso raccolto dagli individui morti di vaiuolo, e contro le inoculazioni endovenose del micrococco aureo isolato dagli individui morti di vaiuolo, la stessa lesione non è capace d'immunizzare i cani contro le inoculazioni endovenose dei comuni stafilococchi piogeni aurei isolati da processi patologici affatto diversi dal vaiuolo.

È qui utile far notare che questi esperimenti nei cani sono stati fatti sempre con l'aiuto di molti cani che servivano come controllo.

La stessa coltura di micrococco aureo, o di stafilococco piogene aureo che s'inoculava nella vena giugulare del cane che aveva subito la vaccinazione, s'inoculava contemporaneamente ad un cane che non aveva subita la vaccinazione.

Tanto i cani vaccinati, quanto quelli non vaccinati, inoculati nella vena giugulare con le diverse colture di stafilococchi piogeni

aurei, isolati da diversi processi patologici dell'uomo e degli animali, sono morti con lo stesso reperto.

Visto che era impossibile ottenere dal vaccino una coltura che sulla cute dei cani riproducesse la lesione tipica prodotta dal vaccino, e che innestata sulla stessa cute fosse capace d'immunizzare i cani contro la inoculazione endovenosa del materiale vaiuoloso, o del micrococco aureo, si sono fatti diversi tentativi per vedere se era possibile trasformare questo ultimo in vaccino.

Tutti i tentativi fatti sono riusciti vani.

Non si è riusciti in questa trasformazione nè con gli agenti fisici e chimici, nè facendo passare il micrococco aureo attraverso l'organismo di animali poco suscettibili, come la pecora ed il gatto. Sarebbe inutile riferire qui tutti gli esperimenti fatti quando i risultati sono stati costantemente negativi.

Tutto quanto si è esposto farebbe credere che il parassita del vaiuolo, quantunque morfologicamente identico al parassita del vaccino, sia una varietà da questo diversa, dotata di diverso potere patogeno.

Gli autori a questo riguardo si dividono in due scuole, delle quali l'una ammette la identità del contagio del vaiuolo con quello del vaccino, l'altra la diversità (1).

I pezzi di cute tolti ai cani vaccinati furono colorati con ematossilina iodica.

La lesione istologica prodotta sulla cute dei cani dai parassiti del vaccino è identica a quella che si osserva sulla cute vaiuolosa. Per osservare le forme parassitarie nel corpo protoplasmatico delle cellule malpighiane bisogna colpire il momento in cui non ancora è avvenuta la infiltrazione cellulare dell'epitelio malpighiano.

Le forme parassitarie presentano le stesse particolarità di struttura di quelle osservate nella cute umana. La genesi delle pustole è simile a quella che si osserva nella cute umana e nella cute dei cani cui si sono inoculati per via endovenosa il materiale vaiuoloso, o le colture di micrococco aureo. Lo studio dei parassiti del vaccino sulla cute dei cani riesce abbastanza difficile, perchè la cute si taglia abbastanza difficilmente. Meglio assai riesce lo studio di questi parassiti nelle cellule epiteliali della cornea del coniglio, come appunto ha suggerito il Guarnieri. Riescono utili non tanto le sezioni perpendicolari alla superficie della cornea, quanto quelle

---

(1) Hervieux. Bulletin de l'Acad. de Méd. Volume 34, 1895. Eilerts de Haan. Annales de l'Institut Pasteur. Vol. 10.

fatte parallelamente alla superficie. A questo modo si possono avere delle sezioni costituite quasi interamente dall'epitelio corneale.

Le cornee dei conigli sono state escisse dopo 24, 48, 72 ore, e sono state fissate in sublimato ed acido acetico. Le colorazioni si sono fatte con ematossilina iodica. I parassiti sono liberi ed endocellulari.

Quelli liberi sono perfettamente simili alle forme giovani endocellulari. Sono intensamente colorati, rotondi e circondati dal solito alone chiaro. Le forme medie sono alquanto più grandi, rotonde e meno intensamente colorate delle forme giovani. Le forme adulte non hanno più la forma rotonda, ma irregolare: sono meno intensamente colorate delle forme medie, e sono circondate da un alone meno chiaro che non le forme giovani e medie. Qualche volta nella stessa cellula accanto ad una forma adulta si possono vedere una, o più forme giovani (Fig. 15 a 20-22-28-29).

***

In ultimo riferiamo le *esperienze fatte col siero dei cani vaccinati e col siero dei cani vaccinati ed inoculati per via endovenosa con il materiale vaiuoloso, o con la coltura di micrococco aureo.*

Mentre alcuni autori affermano che il siero di sangue degli animali vaccinati, o dei convalescenti di vaiuolo inoculato nel connettivo sottocutaneo non impedisce l'attecchimento del vaiuolo (Sternberg) (1), altri affermano che il siero di sangue dei vitelli vaccinati, inoculato in grandi quantità ad altri animali, li preserva contro l'attecchimento del vaccino (Béclère) (2).

Zagari (3) in una serie di ricerche ha potuto stabilire che l'infezione vaiuolosa nell'uomo non viene modificata dal siero di giovenca, come d'ordinario con cow-pox, anche adoperato a dosi colossali, nè nel generale, nè nel decorso della temperatura, nè sui fatti cutanei. Le iniezioni di questo stesso siero di vacca a conigli danno effetti incerti, e solo qualche volta pare che la pustolazione resti abortita. Il siero di vacca vaiuolizzata per ben due volte amministrato in quantità straordinarie non viene a modificare il corso del vaiuolo. Iniezioni di siero di vaiuolosi guariti, sono capaci d'impedire l'attecchimento degli innesti sia sulla cute, sia sulla cornea di

(1) Centralblatt f. Bakt. Vol. 19.
(2) Annales de l'Institut Pasteur. Vol. 10.
(3) Ufficiale sanitario - Rivista d'igiene, 1897.

conigli, di renderne appena accennate le lesioni, e di arrestarne il corso.

Innanzi tutto abbiamo voluto vedere se il siero *in toto* o diluito di sangue dei cani che avevano superata la vaccinazione e la inoculazione endovenosa del materiale vaiuoloso, o del micrococco aureo isolato dagli individui morti di vaiuolo dava oppur no la reazione agglutinante. Dopo circa mezza ora i micrococchi si vedono riuniti in gruppi più o meno numerosi e nel campo del preparato non se ne vedono più isolati.

A questa reazione non si può dare alcuna importanza, perchè lo stesso fatto si osserva col siero normale di cane. Alle stesse conclusioni è venuto il Petersen (1) per i comuni stafilococchi piogeni.

I cani cui fu inoculato nel connettivo sottocutaneo il siero di sangue di cani vaccinati ed inoculati in giugulare con materiale vaiuoloso, o con colture di micrococco aureo, non furono immunizzati contro la inoculazione endovenosa di materiale vaiuoloso, o di colture di micrococco aureo.

Il siero fu inoculato nella quantità di 20, 40, 80, 100, ecc., centimetri cubi.

La inoculazione endovenosa di materiale vaiuoloso, o di coltura di micrococco aureo fatta contemporaneamente alla inoculazione di siero di sangue di cani vaccinati ed inoculati per via endovenosa con materiale vaiuoloso, o cultura di micrococchi aurei, ha prodotto la morte degli animali.

Gli stessi risultati si sono avuti inoculando il siero di sangue di cani vaccinati, e che avevano superata la inoculazione endovenosa del materiale vaiuoloso, o della cultura di micrococchi aurei, a numerosi conigli.

Questi risultati sono pienamente d'accordo con quelli degli autori che innanzi sono stati citati.

Il siero di sangue dei cani vaccinati inoculato ai cani che erano stati già da 24 ore inoculati per via endovenosa con la coltura di micrococco aureo, non è stato capace d'impedirne la morte.

---

(1) *Ueber Immunisirung und Serumterapie bei der Staphylomycose.* Tübingen, 1897.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I.

FIG. 1. Cellula malpighiana della cute di bambino morto di vaiuolo. Nel corpo cellulare vi è una forma giovane di parassita circondato da alone chiaro. Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

FIG. 2. Cellula malpighiana della cute di bambino morto di vaiuolo. Nel corpo cellulare vi è una forma parassitaria media circondata da alone chiaro. Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

FIG. 3. Cellula malpighiana della cute di bambino morto di vaiuolo. Nel corpo cellulare vi è una forma parassitaria giovane circondata da alone chiaro. Oc. 3. Ob. 1/12 Koristka.

FIG. 4. Cellula malpighiana della cute di bambino morto di vaiuolo. Nel corpo cellulare vi sono due forme parassitarie giovani circondate da alone chiaro. Oc. 3. Ob. 1/12 Koristka.

FIG. 5. Sezione di ghiandola linfatica di bambino morto di vaiuolo. Nel corpo protoplasmatico di alcune cellule linfoidi vi sono parassiti di varia grandezza circondati da alone chiaro. Oc. 3. Ob. 1/12 Koristka.

FIG. 6 e 7. Cellule malpighiane della cute di bambino morto di vaiuolo con forme parassitarie adulte. Oc. 3. Ob. 1/12 Koristka.

FIG. 8. Cellule malpighiane della cute di cane morto in seguito ad inoculazione endovenosa di materiale vaiuoloso. Nei corpi cellulari delle cellule malpighiane si vedono i parassiti circondati da alone chiaro. Oc. 3. Ob. 1/12 Koristka.

FIG. 9 a 14. Cellule linfoidi nel rene di cane morto in seguito ad inoculazione endovenosa di materiale vaiuoloso. Nel corpo cellulare dei leucociti si vedono parassiti di varia grandezza. Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

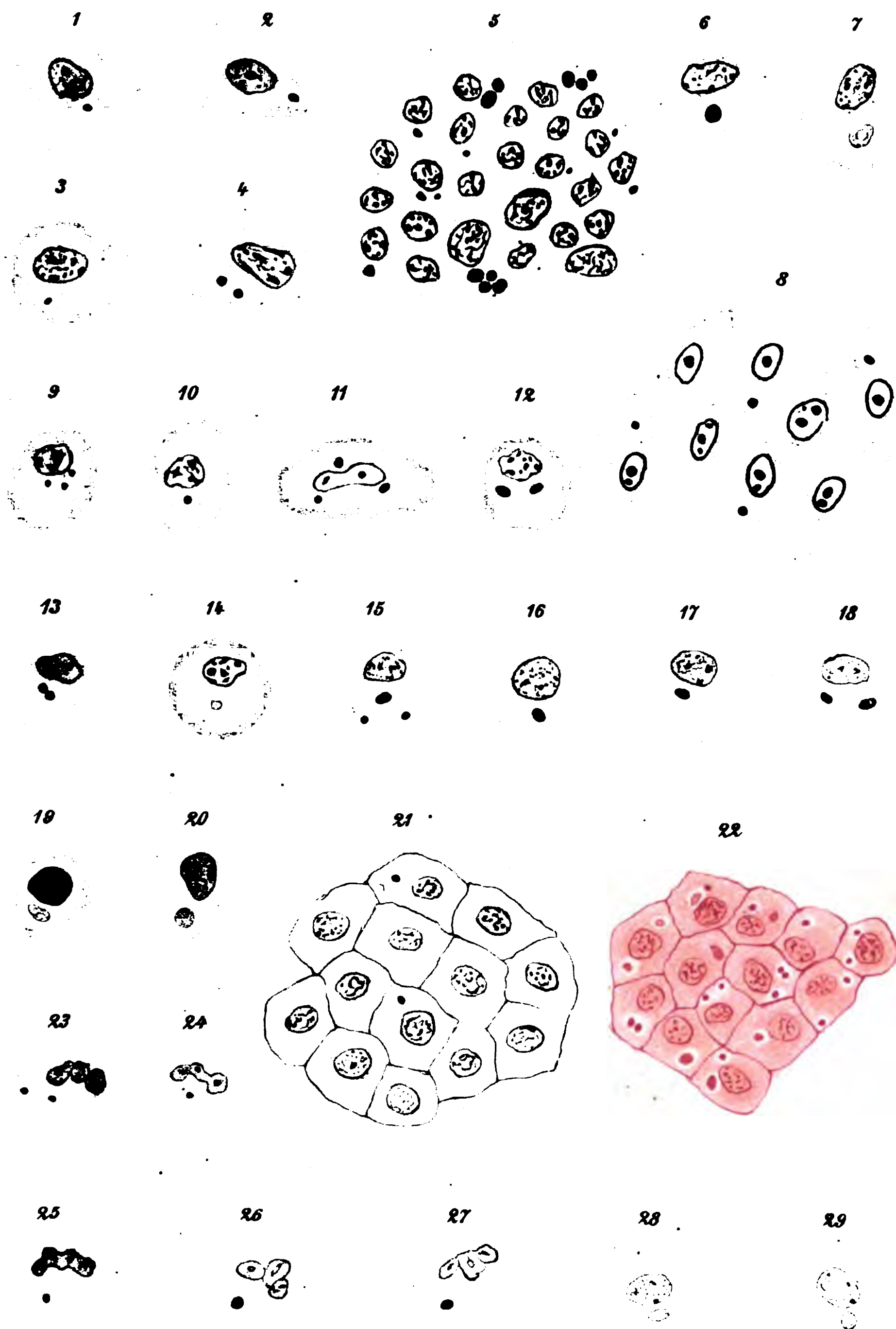
FIG. 15 a 20. Cellule epiteliali della cornea del coniglio innestata con vaccino. Parassiti endocellulari in diversi stadii, da quello giovane a quello adulto (forme involutive). Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

FIG. 21. Sezione di epitelio corneale di cane innestato col micrococco aureo isolato dagli individui morti di vaiuolo. Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

FIG. 22. Sezione di epitelio corneale di coniglio innestato con vaccino. Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

FIG. 23 a 27. Corpuscoli di pus della cornea di cane innestata con stafilococco piogene aureo. Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

FIG. 28 e 29. Cellule epiteliali della cornea di coniglio innestata con vaccino. Parassiti adulti (forme involutive). Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.



Sanfelice dis

Lit. Salussolia, Torino.

Istituto d'Igiene della Regia Università di Cagliari

L'azione patogena dei Blastomiceti

Contributo alla etiologia dei tumori maligni

del professore **FRANCESCO SANFELICE**

(con la tavola II).

I.

Riassunto dei lavori recenti pubblicati intorno all'argomento.

Numerose ricerche sono state pubblicate in questi ultimi anni intorno all'azione patogena dei blastomiceti, alcune in rapporto alla importanza che questi parassiti hanno nella genesi dei tumori maligni, altre riguardanti lesioni affatto diverse dal cancro e dal sarcoma.

Le numerose ricerche pubblicate sui blastomiceti fino a tutto il 1897, tanto dal lato morfologico, quanto da quello sperimentale, tendevano più a mettere in dubbio la importanza dei saccaromiceti nella produzione dei neoplasmi maligni, anzi che ad affermarla.

Io era per conseguenza solo a sostenere, in base ai risultati ottenuti con le inoculazioni del *Saccharomyces neoformans* negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni, che questo parassita inoculato in coltura pura negli organi dei cani può dar luogo alla produzione di tumori epiteliali, i quali per decorso e struttura sono perfettamente identici ai tumori epiteliali maligni che noi osserviamo nell'uomo, ed inoculato nelle vene degli animali dà luogo alla produzione di tumori di natura connettivale.

Tutti questi risultati io avevo ottenuto con il *Saccharomyces*

neoformans, uno dei pochi blastomiceti che trovai dotato di potere patogeno fra tanti che avevo isolati dallo ambiente.

Non avevo più oltre tentato d'isolare blastòmiceti patogeni dai tumori maligni dell'uomo, perchè non potevo disporre di un grandissimo numero di tumori, quale occorreva in questa specie di ricerche e perchè mi ero convinto che lo isolamento dei parassiti dai tumori di lunga data era cosa tutt'altro che facile. Solamente dai neoplasmi a decorso rapido o acuto, come li chiama il Plimmer, e con reperto parassitario abbondante, io prevedeva facile la coltura del parassita, ma questi casi non sono punto frequenti e per ciò difficilmente potevano capitarmi.

Per queste ragioni ho seguito nelle mie ricerche la via indiretta e non quella diretta, tanto più che dai primi esperimenti di inoculazione con le colture pure del *Saccharomyces neoformans* mi ero convinto della sua grande importanza patogena. E ciò che io avevo dapprima supposto, fu ampiamente confermato dalle inoculazioni di questo saccaromicete nei cani.

Oggi non sono più solo a sostenere la importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni, perchè osservatori degni di fede e ben noti nella scienza per importanti lavori hanno confermato quanto io aveva esposto nei miei precedenti lavori, riproducendo con colture pure di blastomiceti, ricavati da tumori maligni dell'uomo, neoplasie epiteliali e connettivali negli animali da esperimento.

Sono innanzi tutto da citare i lavori del Plimmer e del Leopold, due osservatori competenti nell'argomento; il primo perchè parecchi anni or sono si era occupato, insieme con Ruffer, delle forme parassitarie che si riscontrano in alcuni tumori maligni; il secondo perchè da anni aveva rivolta la sua attenzione allo studio della natura parassitaria dei tumori, facendo eseguire delle accurate ricerche al suo assistente, il dott. Rosenthal, sulla struttura del tessuto carcinomatoso e sulle inclusioni cellulari che vi si riscontrano. Questi lavori gli autori hanno pubblicato dopo uno studio di parecchi anni, usufruendo di un grandissimo numero di tumori umani ed eseguendo numerose ricerche sperimentali negli animali.

Il Plimmer (1) nel suo lavoro comparso nell'aprile del 1899 riferisce molto esattamente tutte le mie ricerche intorno all'argomento e mi difende dalle critiche di alcuni osservatori.

Furono esaminati dall'autore 1278 casi di cancro ed in 1130 furono trovati i parassiti liberi o nello interno delle cellule attive, mai in quelle degenerate.

L'analisi dei casi esaminati è sufficiente per dimostrare la costante relazione di questi corpi parassitari col cancro. I parassiti non furono trovati in ugual numero in tutti i cancri. In alcuni cancri a decorso rapido e che l'autore a ragione chiama acuti, furono riscontrati in grandissimo numero. Solamente nove del numero totale dei cancri esaminati erano di questa natura e presentavano quasi tutte le cellule con una o più forme parassitarie.

Secondo il Plimmer i tumori maligni a decorso rapido dipendono dalla diminuita resistenza dell'organismo o dalla aumentata virulenza del microrganismo, ovvero da tutte e due le condizioni.

In un caso di cancro a decorso rapido, nel quale con l'esame microscopico si vedevano numerosissimi parassiti, l'autore è riuscito ad ottenere una coltura di blastomicete. Il substrato di nutrizione che gli è servito per isolare questo microrganismo si componeva di un infuso di cancro, fatto nel modo che si fa il comune infuso di carne con aggiunta, dopo neutralizzazione, del 2 per cento di glucosio e dell'1 per cento di acido tartarico.

La coltura di questo blastomicete patogeno mi è stata gentilmente inviata dal Plimmer ed ho potuto constatare che per le proprietà culturali e morfologiche non si differenzia punto dal *Saccharomyces neoformans*.

Non si spiega veramente il riserbo espresso dal Plimmer nello stabilire la natura del parassita, riserbo che sembra egli si sia imposto per un male inteso riguardo verso il Metschnikoff, il quale, avendo molto leggiermente battezzato per coccidi i parassiti del cancro, ha fatto cadere in errore tutti gli osservatori che mi hanno preceduto.

I risultati sperimentali ottenuti dall'autore si dividono in tre gruppi: nel primo vi sono quelli negativi; nel secondo quelli in cui si ottenne la morte degli animali senza lesioni degli organi; nel terzo quelli in cui si ottenne la morte degli animali con neoproduzione di origine endoteliale.

Il reperto che l'autore descrive nelle cavie morte in seguito ad inoculazione del parassita in addome è perfettamente simile a quello che dà il *Saccharomyces neoformans*.

Il Plimmer è stato il primo a praticare le inoculazioni del blastomicete patogeno da lui isolato nell'epitelio corneale dei conigli ed ha osservato proliferazione delle cellule epiteliali e presenza dei parassiti nello interno delle cellule.

Le conclusioni cui è venuto l'autore sono le seguenti:

1° Nel cancro vi sono speciali corpi intracellulari che non appartengono a processi di degenerazione, che non si trovano in altri tessuti patologici e che si osservano alla parte periferica della neoplasia e non nelle parti degenerate;

2° Che vi sono dei casi rari di cancro nei quali questi corpi sono numerosissimi;

3° Che questi parassiti possono essere isolati e coltivati in substrati artificiali di nutrizione;

4° Che queste colture inoculate in alcuni animali producono la morte con produzione di tumori epiteliali e connettivali.

Queste conclusioni confermano pienamente quanto io avevo trovato e descritto intorno all'azione patogena dei blastomiceti.

Il fatto che lo stesso blastomicete patogeno nell'uomo ha dato origine ad

un tumore maligno di natura epiteliale e nella cavia ha prodotto una neoformazione di natura connettivale, era stato da me già osservato nelle ricerche sul potere patogeno del *Saccharomyces neoformans*, il quale inoculato nei cani può produrre neoformazioni epiteliali e neoformazioni connettivali.

Con un blastomicete patogeno isolato da un tumore maligno dell'uomo non si può certo sperare di riprodurre nelle cavie un cancro o un sarcoma, per la ragione che in questi animali i blastomiceti patogeni dànno luogo ad una infezione diffusa con produzione di neoformazioni, le quali sono molto ricche di parassiti e presentano una scarsa reazione da parte degli elementi cellulari.

Tra la infezione blastomicetica diffusa della cavia ed il tumore maligno dell'uomo vi è la stessa differenza che corre tra la tubercolosi polmonare dell'uomo e la tubercolosi diffusa della cavia, tra la polmonite nell'uomo e la setticoemia salivare del coniglio, tra l'actinomicosi nel mascellare del bue e la pseudotubercolosi diffusa della cavia, prodotta con la coltura di *Streptothrix* isolata dal tumore actinomicotico del bue.

La riproduzione del processo patologico simile a quello che si osserva nell'uomo non si potrà avere che negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni per struttura e decorso simili a quelli dell'uomo, cioè a dire nel cane, nel bue, nel cavallo.

È perciò necessario, quando s'isola un blastomicete patogeno da un tumore maligno, prima di negare la sua importanza patogena, praticare numerose inoculazioni nei cani.

Non meno importante del lavoro del Plimmer è quello del Leopold (2), il quale ha studiato più centinaia di cancri, specialmente dell'utero, delle ovaie, delle tube, della vagina, degli organi genitali esterni, della mammella, del peritoneo, dell'omento. Furono esclusi i tumori ulcerati.

Piccoli pezzi di tumore raccolti con tutte le regole antisettiche furono osservati in liquidi sterilizzati sotto al campo del microscopio contenuto in un apparecchio speciale a temperatura da regolarsi esattamente mediante termoregolatore fatto costruire appositamente dall'autore.

Il materiale di ricerca non fu preso mai dalla parte superficiale del tumore, ma sempre dalla parte profonda o dalla parte centrale dei giovani noduli.

Fu data grande importanza alla ricerca microscopica di piccolissimi pezzi del tessuto carcinomatoso giovane in goccia pendente, alla temperatura di 37° C. per osservare dopo più tempo le modificazioni che presentavano le forme ritenute parassitarie.

Per le colture furono utilizzati quei pezzi di tumore osservati in gocce pendenti di liquidi nutritivi dimostratisi privi di comuni bacilli e cocchi. Come mezzi di nutrizione servirono il brodo sterile, il siero di sangue sterile, soluzioni di zucchero di uva, gelatina neutra ed acida, ecc.

Il Leopold condanna, come ho già fatto nei miei precedenti lavori, tutti quegli osservatori che si sono scagliati contro la teoria parassitaria dei tumori maligni, facendo solamente ricerche microscopiche e molto giustamente afferma che nulla si può concludere, senza praticare numerosi esperimenti col tessuto fresco e con le colture pure ottenute da questo.

Su venti carcinomi sottoposti allo esame culturale, quattro volte è riuscito al Leopold di ottenere colture pure di blastomiceti.

I casi nei quali si ottennero le culture sono i seguenti:

1° Carcinoma ovarico. Si fissarono sotto al campo del microscopio le forme parassitarie e si videro dopo qualche tempo moltiplicare per gemmazione. Si fecero trapianti in tre tubi di gelatina neutra e dopo alcuni giorni si ottenne lo sviluppo di una patina bianca composta di elementi rotondi a doppio contorno, simili perfettamente ai blastomiceti;

2° Carcinoma delle due ovaia. Con la stessa tecnica seguita nel caso precedente si ebbe sulla superficie della gelatina lo sviluppo di un blastomicete sotto la forma di una patina bianca;

3° Carcinoma della mammella destra ed infiltrazione carcinomatosa delle glandole ascellari. Si ottenne con la stessa tecnica lo sviluppo di un blastomicete che formava patina bianca sulla superficie della gelatina;

4° Carcinoma port. vagin. uteri. Anche da questo caso si ottenne una coltura pura di blastomicete non dissimile dalle altre.

Con le inoculazioni di tessuto carcinomatoso negli animali, il Leopold ha ottenuto sopra quattro esperimenti due risultati positivi, riscontrando nel primo caso un tumore di natura sarcomatosa (sarcoma midollare) nella cavità addominale di un ratto. Nel secondo caso si riscontrò un tumore nella parte superiore della cavità addominale di un coniglio che rimase stazionario per alcuni mesi. Dopo quattro anni e cinque mesi l'animale morì ed alla sezione si vide che il fegato era cosparso di noduli grigiastri ed i polmoni presentavano noduli di varia grandezza. Tanto i noduli del fegato, quanto quelli del polmone, erano di natura epiteliale.

Inoculando nei ratti le colture pure del blastomicete isolato dal caso 2° (carcinoma dell'ovaio) il Leopold ho ottenuto tumori di struttura simile ai sarcomi a cellule giganti.

Le conclusioni che il Leopold trae dalle sue ricerche sono le seguenti:

1° Nei carcinomi delle ovaia con la osservazione microscopica si rinvengono blastomiceti.

2° Dal tessuto carcinomatoso fresco si ottengono colture pure di blastomiceti.

3° Queste colture pure inoculate nei testicoli di un ratto produssero un gran numero di noduli peritoneali di natura sarcomatosa.

4° Da questi noduli si ottennero di nuovo in coltura pura i blastomiceti.

Coi lavori dunque del Plimmer e del Leopold sono pienamente confermate le mie ricerche intorno alla importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni.

Il Petersen e l'Exner (3) non hanno fatto altro che confermare le mie ricerche dimostrando che la inoculazione intraperitoneale dei blastomiceti patogeni produce nelle cavie alterazioni più considerevoli che non la inoculazione sottocutanea e che le neoformazioni prodotte sono dovute più allo accumulo dei parassiti anzichè alla proliferazione degli elementi cellulari.

È stato un errore degli autori il credere che con le inoculazioni di blastomiceti patogeni si potevano riprodurre nelle cavie dei cancri e dei sarcomi. Se almeno avessero letto quanto precedentemente era stato pubblicato intorno all'azione patogena dei blastomiceti nelle cavie, avrebbero saputo

che nelle cavie finora nessuno ha potuto riprodurre tumori maligni con la inoculazione di blastomiceti patogeni.

Il Nichols (4) crede che i cancri da me prodotti nei cani con le inoculazioni di *Saccharomyces neoformans* non sieno il risultato della inoculazione, ma sieno dovuti a pura coincidenza.

Questa stessa obbiezione mi è stata mossa anche dal Baumgarten, ma senza alcun fondamento, perchè finora ho avuto parecchi casi positivi nei cani e se la coincidenza può sospettarsi per una o due volte, non può certo ammettersi da persone ragionevoli, quando la riproduzione del cancro con la inoculaziene del *Saccharomyces neoformans* è riuscita parecchie volte.

Nè d'altra parte si può credere che io abbia preso per cancri dei semplici granulomi, perchè osservatori competenti e degni di fede come il Plimmer ed il Leopold, lavorando indipendentemente da me, hanno riprodotto negli animali da esperimento tumori di natura epiteliale inoculando anche blastomiceti. Ora è impossibile ammettere che tre persone sieno cadute in un errore così grossolano.

Inoltre tra il manifestarsi di un processo patologico e la praticata inoculazione del parassita, fattore di tale processo, vi è tale un rapporto, come di effetto a causa, che manca se si tratta di pura coincidenza.

Il Nichols afferma che le forme parassitarie del cancro sono affatto diverse dai blastomiceti che si osservano nei tessuti delle cavie e dei conigli. Con ciò egli dimostra di non aver saputo trovare i veri parassiti del cancro e di aver preso per parassiti alcune forme di degenerazione cellulare che nulla hanno a che fare coi veri parassiti.

La identità tra i veri parassiti del cancro ed i blastomiceti inoculati negli animali è ammessa dal Plimmer, dal Leopold, dal Sawtchenko e da me, e non credo possa mettersi più in dubbio. Chi tale identità non ammette non ha saputo vedere i veri parassiti dei tumori maligni dell'uomo, e che così sia nel caso del Nichols è dimostrato alla evidenza dalle figure annesse al suo lavoro.

L'autore non crede che i blastomiceti sieno la causa del cancro, perchè avendo fatto colture da 13 casi, non ha avuto risultati positivi. Chi si è occupato con cura dell'argomento sa che non è cosa facile ottenere le colture. Al Plimmer che ha esaminato più di 1000 tumori non è riuscito che una sola volta coltivare i parassiti. Non fanno quindi nessuna meraviglia i risultati negativi del Nichols da un numero tanto esiguo di tumori.

Un altro lavoro più critico che originale sulle teorie parassitarie del cancro è quello del Borrel (5).

Secondo il Borrel tutte le forme parassitarie descritte dal Nils Sjobring, dal Soudakewitsch, dal Foà, dal Ruffer, dal Podwyssotzky e dal Sawtchenko sono da spiegare con la evoluzione atipica di un elemento della cellula cancerigna, la sfera di attrazione o meglio l'arcoplasma.

La spiegazione data dall'autore non ha ragione di essere perchè tutte le forme parassitarie da lui disegnate nelle tavole annesse al suo lavoro non hanno nulla a che fare coi veri parassiti del cancro.

Tutti gli osservatori che prima di me si sono occupati dei parassiti del cancro e li hanno descritti come coccidi, nella smania di trovare nell'interno delle cellule qualche cosa che ricordasse le forme dei protozoi, hanno descritto e figurato, insieme coi veri parassiti, inclusioni e degenerazioni cellulari. Sono

appunto questi pseudoparassiti che il Borrel ha preso in considerazione nel suo lavoro, lasciando da parte le vere forme parassitarie.

La prima obbiezione che il Borrel fa alla teoria blastomicetica è che le diverse varietà d'inclusioni non possono essere considerate come blastomiceti e che, se vi sono blastomiceti nei cancri, essi non si trovano certamente nelle cellule epiteliali.

Sono completamente della opinione dell'autore nello ammettere che le inclusioni da lui descritte e figurate non sono blastomiceti, ma degenerazioni cellulari che non hanno nulla a che fare coi veri parassiti.

Quanto alla affermazione aprioristica che i blastomiceti non possono penetrare nello interno delle cellule epiteliali, basta citare le osservazioni del Plimmer e del Leopold che, confermando le mie ricerche, hanno osservato veri parassiti nell'interno delle cellule epiteliali. Per convincersi del fatto il Borrel avrebbe dovuto praticare delle inoculazioni sull'epitelio corneale del coniglio o del cane ed allora avrebbe veduto molti blastomiceti nell'interno delle cellule epiteliali proliferate.

L'altra obbiezione del Borrel sta nel fatto che non si ottengono colture di blastomiceti dai tumori, quando si opera con tutte le regole antisettiche ed a questo proposito egli cita le ricerche del Maffucci e del Sirleo, i quali qualche volta hanno ottenuto colture di blastomiceti, ma le hanno considerate come accidentali, perchè delle piastre di controllo esposte nel medesimo tempo all'aria del laboratorio presentavano anche colonie di blastomiceti.

L'autore si limita a riferire i risultati negativi del Maffucci e del Sirleo, perchè favorevoli alla sua tesi, e dimentica i risultati positivi del Plimmer e del Leopold, due osservatori altrettanto valenti quanto i due primi.

Il Gaylord (6) in un lavoro pubblicato nello scorso anno riferisce di avere raccolto asetticamente il liquido della cavità addominale di un individuo colpito da adenocarcinoma dell'appendice vermiforme e di aver fatto inoculazioni in alcuni animali. Tra questi una cavia inoculata in vena giugulare ed uccisa dopo qualche tempo presentò noduli di natura epiteliale nei polmoni.

L'autore non avendo potuto ottenere colture di blastomiceti ed avendo trovato una certa somiglianza delle forme parassitarie endocellulari con quelle descritte dal Guarnieri nell'epitelio corneale del coniglio afferma che i parassiti del cancro appartengono ai protozoi.

Da quanto il Gaylord scrive e dalle figure annesse al lavoro appare chiaro che egli ha preso per parassiti alcune forme di degenerazioni cellulari.

Gli esperimenti fatti dall'autore sono troppo scarsi per autorizzarlo a trarre delle conclusioni.

Lo Sternberg (7) recentemente ha pubblicato una serie di ricerche sperimentali su alcuni oidii e su alcuni blastomiceti patogeni isolati dal Busse, dal Curtis, dal Leopold e da me.

L'autore riconosce giustissima la separazione prima da me consigliata e poi seguita dal Cao e dal Carnevali del gruppo degli oidii da quello dei blastomiceti propriamente detti.

Il blastomicete patogeno più importante sul quale l'autore ha fatto ricerche è quello acquistato dal Kral e che io isolai da un adenocarcinoma dell'ovaio.

Col blastomicete patogeno da me isolato lo Sternberg ha fatto parecchie inoculazioni endovenose nei cani ed una sola inoculazione nelle mammelle. Nei cani uccisi o morti in seguito alla inoculazione endovenosa ha riscontrato tutte le lesioni da me descritte e figurate. Nella cagna inoculata nelle mammelle non ha osservato nulla di speciale.

Siamo discordi nella interpretazione delle neoformazioni prodotte nei cani con le inoculazioni endovenose del blastomicete patogeno. Quantunque l'autore affermi che i gruppi di cellule epitelioidi neoformate hanno l'aspetto di un vero tumore, finisce col conchiudere che si tratta di un tessuto di granulazione. Lo Sternberg non porta alcuna buona ragione per negare quanto io ho affermato nei miei precedenti lavori che cioè si tratta di neoformazioni connettivali da paragonarsi alle metastasi che avvengono nell'uomo in seguito allo sviluppo di un sarcoma. Già in altro lavoro paragonai le lesioni osservate nei cani morti in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni alle lesioni riscontrate dal Busse negli organi della donna morta in seguito allo sviluppo di un sarcoma molle della tibia, e lo stesso Busse non ha potuto negare la esattezza della mia affermazione.

Dal risultato negativo di una sola inoculazione nelle mammelle di una cagna col blastomicete patogeno da me isolato l'autore non era veramente autorizzato a conchiudere che i blastomiceti non sono capaci di produrre tumori epiteliali. Egli spiega, come hanno fatto altri, i casi positivi da me ottenuti con l'ammettere che si tratta di pura coincidenza.

Siccome nella mia quinta memoria affermai che sopra 59 cani inoculati avevo ottenuto tre risultati positivi, lo Sternberg fa presto a paragonare questo numero di tumori con quello osservato dal Casper e dal Johne ed a conchiudere che essendo il numero delle neoplasie da me prodotto uguale a quello che si osserva nei cani senza alcuna inoculazione di blastomiceti, i miei risultati positivi devono ritenersi come accidentali.

Lo Sternberg però ignora che sul numero totale di 59 cani sottoposti ad esperimento fino al 1898 bisogna toglierne quelli che furono inoculati in vena giugulare. La percentuale allora dei risultati positivi da me ottenuti sale al 10.3 ed è superiore di molto a quelle osservate dal Casper (4.7 %) e dal Johne (5.8 %) (1).

Altri osservatori si sono occupati di ricercare i *blastomiceti in lesioni patologiche diverse dai tumori maligni.*

Lavori sperimentali fatti molto accuratamente sono quelli del Gilchrist (8) il quale da solo ed insieme con Royal Stokes ha trovato i blastomiceti in alcune affezioni cutanee dell'uomo che si presentavano coi caratteri di affezioni lupose ed ha potuto isolare i parassiti in coltura pura.

Certo è molto importante che in processi d'infiammazione cronica della cute, caratterizzati da infiltrazione parvicellulare del corion, si sieno trovati e coltivati dei blastomiceti capaci anche di produrre delle alterazioni negli animali da esperimento.

Le osservazioni del Gilchrist in parte confermano le osservazioni del Gonella (9) e del Guarnieri (10) che hanno riscontrato blastomiceti nella

---

(1) Le percentuali di Casper e Johne comprendono i carcinomi ed i sarcomi.

congiuntivite tracomatosa, del Secchi (11) il quale li ha descritti nell'acne cheloide, del De Simoni (12) che li ha veduti nelle tonsille ipertrofiche, del Mazza (13) il quale recentemente ha trovato gran numero di blastomiceti nel rinoscleroma. Tutte queste ultime ricerche non hanno gran valore, perchè non sono accompagnate dagli esperimenti d'inoculazione dei blastomiceti e di riproduzione dei processi patologici, nei quali con la sola ricerca microscopica sono state vedute forme blastomicetiche.

***

In questi ultimi anni ho continuato ad occuparmi dell'azione patogena dei blastomiceti in rapporto alla genesi dei tumori maligni, limitandomi allo studio di un blastomicete, il *Saccharomyces neoformans*, il quale dalle prime inoculazioni praticate nei cani mi aveva dato molto a sperare.

Per dimostrare la etiologia dei tumori maligni si potevano seguire due vie, quella diretta, inoculando tumori maligni dell'uomo o le colture di blastomiceti da essi ottenute negli animali suscettibili, e quella indiretta, cercando di isolare dallo ambiente i blastomiceti ed inocularli negli animali. Da principio ho seguìto l'una e l'altra via, ma ben presto mi sono accorto che era molto difficile ottenere risultati positivi seguendo la prima.

Seguendo la via indiretta bisognava innanzi tutto dimostrare che, inoculando colture pure di *Saccharomyces neoformans* negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni, si riproducevano le forme libere ed endocellulari descritte dagli osservatori, come appartenenti ai coccidi e le forme libere ed endocellulari descritte dal Russell col nome di corpuscoli a fucsina.

In secondo luogo bisognava dimostrare chè i blastomiceti, inoculati in coltura pura negli stessi animali, sono capaci di produrre delle neoplasie per decorso e struttura perfettamente identiche a quelle che si osservano nell'uomo.

Se io sia riuscito a dimostrare questi fatti, si vedrà nel presente lavoro.

II.

Inoculazioni dei blastomiceti nell'epitelio corneale dei cani.

Queste inoculazioni ho fatto allo scopo di seguire l'azione che i parassiti sono capaci di esercitare sulle cellule dell'epitelio corneale.

Simili ricerche sono state fatte la prima volta dal Plimmer nei conigli ed hanno dato per risultato la proliferazione delle cellule epiteliali e la presenza di blastomiceti nello interno di queste cellule.

Io ho voluto studiare da una parte il destino dei parassiti, dall'altra la proliferazione epiteliale.

I blastomiceti patogeni inoculati nell'epitelio corneale dei cani sono capaci di determinare tale una proliferazione delle cellule epiteliali che con ragione può meritare il nome di neoformazione.

Esperimenti di controllo fatti con mezzi meccanici, fisici e chimici sull'epitelio corneale dei cani non hanno mai dato luogo ad una neoformazione delle cellule epiteliali quale si è osservata dopo la inoculazione dei blastomiceti patogeni.

Ho avuto anche la cura di praticare numerose inoculazioni con colture pure di blastomiceti non patogeni e non ho osservato alcuna proliferazione delle cellule epiteliali. Per questa ragione lo innesto corneale dei blastomiceti ha grande importanza per decidere la quistione, se trattasi di blastomiceti patogeni oppur no.

Fatte numerose scarificazioni sull'epitelio corneale, deponevo con l'ago di platino un po' della patina colturale presa da una coltura su patata.

Ho tolto le cornee ai cani dopo dieci, venti giorni, un mese, due mesi, tre mesi. Appena enucleato il bulbo, avevo cura di lavarlo ripetutamente in acqua per togliere ogni traccia di sangue o di sudiciume che potesse essere deposto sulla cornea; poi con cura toglieva intera la cornea e la fissavo o in sublimato acetico o in alcool assoluto.

Come liquidi coloranti ho usato indifferentemente la ematossilina iodica ovvero il violetto di genziana ed il paracarminio.

Le colorazioni *in toto* con la ematossilina mi hanno dato ottimi risultati. I parassiti si possono facilmente riconoscere anche da un occhio poco esercitato, perchè assumono una colorazione affatto diversa dagli elementi del tessuto.

Le sezioni in parte sono state fatte perpendicolarmente alla superficie della cornea, in parte tangenzialmente. Macroscopicamente nei primi giorni dopo praticata la inoculazione si osserva un leggiero opacamento della cornea che nei giorni consecutivi va aumentando, fino a che compare un ispessimento di colore bianchiccio che permane a lungo. Questo ispessimento dell'epitelio non è regolare in tutta la sua estensione, ma dove è più e dove meno pronunziato.

Ho conservato in vita parecchi cani nei quali avevo praticato lo innesto corneale e mai ho veduto scomparire l'ispessimento epiteliale formatosi, che è rimasto sempre limitato senza produrre alcun disturbo generale.

Dallo studio delle sezioni ho potuto vedere che in un primo

tempo i parassiti parte si localizzano nel protoplasma delle cellule epiteliali, parte penetrano al disotto dell'epitelio ed in massima parte sono inglobati dai leucociti.

In un secondo tempo, dopo circa venti giorni dalla praticata inoculazione, avviene una diminuzione nel numero dei parassiti e comincia la proliferazione delle cellule epiteliali.

Molto interessante è lo studio delle forme parassitarie che si trovano nel protoplasma cellulare. Si possono distinguere in forme giovani, adulte e vecchie. Tutti questi parassiti endocellulari hanno il carattere comune di scavarsi una nicchia nel protoplasma cellulare, sicchè appaiono circondati da un alone chiaro.

Le forme giovani più piccole o si presentano omogeneamente ed intensamente colorate ovvero presentano una parte centrale più intensamente colorata ed una parte periferica meno intensamente colorata.

Le forme adulte o sono omogeneamente colorate, alle volte provviste di membrana ialina ovvero presentano la sostanza cromatica limitata alla periferia in forma di cercine o al centro in forma di granulo.

Le forme vecchie hanno scarsa sostanza cromatica ovvero non ne presentano punto ed allora appaiono come cercini ialini.

Spesso in una stessa cellula epiteliale vi sono più forme parassitarie.

Nel tessuto sottoepiteliale si vedono forme endocellulari e libere, che presentano le medesime particolarità di struttura, di cui si è detto innanzi.

Nel protoplasma delle cellule epiteliali si osservano pure dei leucociti che si possono facilmente distinguere dalle forme parassitarie, perchè si colorano in violetto, mentre i parassiti prendono un colorito marrone scuro e perchè presentano una disposizione della sostanza cromatica affatto diversa da quella dei parassiti.

Le cellule epiteliali corneali non presentano altra alterazione oltre la vacuolizzazione del protoplasma prodotta dai parassiti.

Quando i parassiti sono diminuiti, incomincia la proliferazione dell'epitelio. Si verifica allora una disorientazione degli elementi cellulari in guisa che o si formano dei cordoni che si approfondano nel tessuto sottoepiteliale, ovvero si formano dei nidi o globi cellulari, simili a quelli che si osservano in alcuni epiteliomi.

Sul modo come avviene la disorientazione delle cellule epiteliali è facile persuadersi tanto nelle sezioni perpendicolari alla superficie della cornea, quanto in quelle tangenziali.

Quanto più progredisce la neoformazione epiteliale, tanto più diminuisce il numero dei parassiti. Questo fatto già da me osservato nei cani, nei gatti e nelle cavie morte in seguito ad inoculazione endovenosa del *Saccharomyces neoformans*, si vede ancora meglio nelle neoformazioni dell'epitelio corneale.

Quanto alla denominazione delle neoformazioni epiteliali determinate nei cani con lo innesto corneale dei blastomiceti patogeni non è cosa facile pronunziarsi.

Sono stati descritti parecchi casi di papilloma ed epitelioma della cornea e se si legge la descrizione degli epiteliomi della cornea osservati nell'uomo si trova che può applicarsi alle neoformazioni sperimentali innanzi descritte.

III.

Inoculazione dei blastomiceti negli organi.

Quantunque le inoculazioni dei blastomiceti patogeni negli organi dei cani (mammella-testicolo) dieno risultati positivi meno frequenti delle inoculazioni endovenose, pure la percentuale di 8.4 (1) da me ottenuta è di molto superiore a quella osservata dal Casper e dal Johne. La percentuale di carcinomi osservata dal Casper nei cani è di 1.9 e quella osservata dal Johne è di 3. Cadono quindi tutte le obbiezioni di quegli osservatori, i quali hanno voluto spiegare i risultati positivi da me ottenuti come pure coincidenze.

Il primo dei risultati positivi l'ho osservato in una cagna e la lesione prodotta è stata da me descritta nella memoria terza (14). In questo primo caso affermai trattarsi di un processo neoplastico, ma non mi pronunziai nella denominazione del tumore, perchè questo non presentava la struttura tipica dei tumori epiteliali, nè quella dei tumori connettivali.

Oggi, dopo aver fatte molte altre inoculazioni nei cani e dopo avere compresa meglio l'azione patogena che il *Saccharomyces neoformans* esercita su di essi, posso spiegare meglio, come farò in seguito, la genesi della lesione osservata in questa cagna.

---

(1) I cani inoculati negli organi fino al 1898 furono 29 e quelli inoculati nello stesso modo fino al 1901 furono 30.

Il secondo risultato positivo l'ho avuto in una cagna inoculata nelle due mammelle posteriori con colture pure di *Saccharomyces neoformans* già passata attraverso l'organismo del cane.

Nei primi giorni dopo la inoculazione fatta nel modo solito, prendendo cioè con l'ago di platino un po' della patina culturale, facendone emulsione in acqua sterile ed inoculandone una piccola parte con una delle comuni siringhe, l'animale presentò una leggiera reazione nel sito d'inoculazione, con leggiera tumefazione delle mammelle.

Dopo alcuni giorni scomparvero del tutto i sintomi di questa reazione e le mammelle apparvero del tutto normali. Fu dopo un mese e qualche giorno che si cominciò ad osservare che le mammelle erano alquanto ingrossate.

Con la evoluzione del tumore, specialmente verso gli ultimi mesi, si osservò un considerevole dimagramento.

L'animale morì dopo 10 mesi ed alla autopsia furono constatate le seguenti alterazioni: la mammella posteriore destra presenta la grandezza di un mezzo uovo ed è molto consistente alla palpazione; la mammella posteriore sinistra è poco più piccola di un mezzo uovo ed è ugualmente dura alla palpazione; la cute che ricopre le due mammelle è in alcuni punti molto aderente da non potersi sollevare in pieghe. Le glandole inguinali d'ambo i lati sono molto ingrossate, le più grandi raggiungono la grandezza di una mandorla, le più piccole quella di una nocciuola; numerose sono le glandole comprese in mezzo al tessuto cellulo-adiposo dell'inguine.

Nello addome le glandole linfatiche sono alquanto ingrossate; nessuna alterazione si osserva nel fegato, nella milza e nei reni; neanche nella cavità toracica e cranica si notano alterazioni.

I numerosi tentativi di coltura riuscirono negativi, tanto dai tumori principali, quanto dalle numerose glandole linfatiche.

Nelle sezioni delle parti centrali dei tumori (Fig. 1) si osservano una serie di tubuli epiteliali tagliati in varia direzione, sostenuti da un tessuto connettivo spesso, con nuclei piuttosto scarsi.

Questi tubuli epiteliali per la loro struttura e per la loro disposizione ripetono il tipo della glandola mammaria normale.

La parte periferica del tumore (Fig. 2) presenta una struttura alquanto diversa dalla parte centrale. Mentre le cellule epiteliali che rivestono i tubuli della parte centrale sono basse, quasi pavimentose, quelle che rivestono i tubuli della parte periferica sono cellule cilindriche alte. Inoltre mentre nelle parti centrali dei tumori il connettivo è abbondante e tende quasi a strozzare le neoformazioni epiteliali, nelle parti periferiche è molto scarso.

Le glandole linfatiche inguinali sono trasformate in un tessuto neoformato simile a quello che si osserva nella parte periferica dei tumori principali. Ritroviamo quindi nelle glandole linfatiche gli stessi elementi epiteliali che costituiscono il tumore principale e quindi si può parlare di vere metastasi glandolari. Alcune delle glandole linfatiche non sono del tutto invase dalla neoformazione e fanno vedere in mezzo al tessuto proprio della glandola linfatica normale dei tubuli epiteliali (Fig. 3). Questi tubuli epiteliali riscontrati nelle glandole linfatiche sono veri trapianti avvenuti attraverso

le vie linfatiche, tanto vero che nelle molte sezioni fatte del connettivo cellulo-adiposo che circondava il tumore, ho potuto seguire il tragitto delle cellule epiteliali.

Dalla descrizione data appare chiaro che si tratta di un adeno-carcinoma della glandola mammaria.

Nella parte centrale del tumore non mi è riuscito di riscontrare forme parassitarie. Solamente nella parte giovane del tumore e nelle metastasi glandolari ho veduto forme parassitarie libere ed endo-cellulari, sotto la forma di corpuscoli a fucsina.

Questo reperto parassitario spiega il risultato negativo delle colture. Come vedremo in seguito, quando i blastomiceti si presentano nei tessuti con la forma tipica dei corpuscoli a fucsina, descritti dal Russell, non sono più coltivabili. È noto che nei tumori dell'uomo a lungo decorso i blastomiceti si presentano sempre sotto la forma di corpuscoli di Russell ed è perciò impossibile in questi casi ottenere in coltura i parassiti.

Il terzo caso positivo l'ho osservato in un cane che fu inoculato nei due testicoli con coltura pura di *Saccharomyces neoformans*.

Nei primi giorni dopo la inoculazione si osservò una leggera tumefazione dei testicoli che scomparve verso il quindicesimo giorno. Dopo più di un mese dalla praticata inoculazione i testicoli erano alquanto ingrossati, ed alla palpazione apparivano di consistenza aumentata. La tumefazione dei testicoli andò lentamente aumentando, e dopo tre mesi dalla praticata inoculazione, oltre al tumore principale, si potevano constatare con la palpazione noduli grandi quanto nocciuole lungo il pene. Al quinto mese al posto dei due testicoli si osservava una massa unica, dura, bernoccoluta; un poco più in alto si toccava un nodulo grande, quanto una grossa nocciuola, sormontato da un altro tumore di forma irregolare. Cercando di aprire l'orifizio prepuziale faceva sporgenza un'altra massa neoplastica, di forma conica, con la base in basso e con l'apice in alto, la quale nascondeva la estremità del pene e per la sua conformazione facilmente si poteva scambiare con questa.

Verso la fine del quinto mese l'animale morì improvvisamente. L'autopsia fu fatta immediatamente dopo la morte con l'assistenza del collega professore Carbone di anatomia patologica, il quale già aveva osservato l'animale in vita.

Tolta la cute che ricopriva il tumore al posto dei testicoli si osserva una massa di tessuto neoformato, di colore bianco-gialliccio, ed intorno al pene si vedono numerosi noduli dello stesso aspetto della massa principale del tumore, alcuni grandi quanto una nocciuola, altri quanto piselli; intorno alla estremità del pene vi è una massa neoplastica conica.

Le glandole linfatiche inguinali sono poco ingrossate.

Nessuna alterazione si osserva negli organi.

I tentativi di coltura dei parassiti dalla massa principale del tumore

e dai noduli secondari non diedero risultato positivo. Risultati negativi diedero anche le colture fatte dagli organi.

Le sezioni del tumore principale osservate al microscopio fanno vedere delle cellule, strettamente ravvicinate le une alle altre, disposte in modo da costituire dei cordoni che in alcune sezioni sono tagliati longitudinalmente, in altre trasversalmente.

Questi cordoni cellulari sono separati da un connettivo lasso. Molte cellule sono in via di riproduzione per divisione indiretta. La medesima struttura presentano i noduli secondari grandi e piccoli.

In tutte le sezioni del tumore non ho riscontrato fasi degenerative.

Quando in un precedente lavoro (15) descrissi il tumore prodotto in questo cane con la inoculazione del *Saccharomyces neoformans*, mi pronunziai per la diagnosi di adeno-carcinoma, perchè le sezioni osservate al microscopio presentavano una struttura tubulare che ricordava un testicolo giovane.

In seguito, avendo avuto la opportunità di studiare un altro tumore simile con la inoculazione dello stesso blastomicete patogeno ho modificato la diagnosi.

Quando appresso descriverò questo altro tumore, dirò della sua origine e della sua natura.

Chi ha lunga pratica dello studio istologico dei tumori del testicolo, sa quanta difficoltà presenta la loro diagnosi.

I parassiti osservati in questo terzo caso sono più numerosi di quelli osservati nel secondo tumore sperimentale e si presentano tutti sotto l'aspetto tipico di corpuscoli a fucsina, alcuni liberi e disposti a gruppi, altri endocellulari.

Nessuna alterazione degna di nota fu osservata nelle sezioni degli organi.

Il quarto caso di tumore fu osservato in una cagna inoculata nella mammella posteriore destra con coltura pura di *Saccharomyces neoformans*.

Parecchi giorni dopo la inoculazione si constatò la presenza di un indurimento nel sito d'inoculazione, e dopo due mesi e mezzo il tumore aveva raggiunto la grandezza di una castagna.

Dopo circa cinque mesi dalla inoculazione l'animale fu osservato dal collega di anatomia patologica, prof. Cesaris Demel.

Dopo sette mesi e mezzo dalla inoculazione l'animale morì in preda a notevole cachessia e ne fu fatta immediatamente la sezione.

La cute è fissata fortemente sul tumore e non si lascia sollevare in pieghe.

Le glandole linfatiche in vicinanza del tumore sono leggermente ingrossate. Non si nota alcuna alterazione negli organi.

Il tumore presenta nelle sezioni la medesima struttura di quello descritto nel secondo caso, e perciò fu fatta diagnosi di adeno-carcinoma.

I parassiti liberi ed endocellulari si presentavano sotto la forma tipica di corpuscoli a fucsina. Le colture fatte con diversi pezzi presi dalla periferia del tumore non diedero risultato positivo.

Il quinto tumore fu osservato in un cane inoculato nei testicoli con coltura pura di *Saccharomyces neoformans*.

Dopo circa un mese in corrispondenza del pene si notavano dei noduli consistenti, spostabili. Nei testicoli non si osservava nulla di anormale.

Al quarto mese dalla inoculazione il cane morì in preda a notevole dimagramento. La sezione fu fatta appena dopo la morte.

Il tumore si componeva di più noduli di varia grandezza aventi sede nel connettivo sottocutaneo del prepuzio. I noduli più grandi nella superficie che guardava il pene, erano ulcerati. Nessuna alterazione presentavano i testicoli e la prostata.

Le glandole linfatiche inguinali erano alquanto ingrossate.

Alla superficie dei reni si notavano dei noduli, al numero di quattro nel destro, al numero di tre nel sinistro, poco sporgenti sulla superficie, di colorito bianco-gialliccio, occupanti nella sezione longitudinale dell'organo buona parte della sostanza corticale. Nella milza si osservavano due noduli grandi quanto piselli, sporgenti sulla superficie convessa. Nessuna alterazione si notò negli altri organi.

Le colture fatte dal tumore e dagli organi non diedero risultato positivo.

Il tumore si è originato nel connettivo del prepuzio perchè ivi è stata fatta la inoculazione del parassita invece che nei testicoli. Lo stesso accadde nel terzo caso, con la differenza che il tumore, essendo di volume maggiore aveva prodotto per compressione l'atrofia dei testicoli. Lo stesso si sarebbe verificato in questo quinto caso, se l'animale fosse ancora vissuto.

Nelle sezioni del tumore osservate al microscopio si nota la stessa struttura innanzi descritta nel terzo caso.

I parassiti si presentano sotto la forma di corpuscoli di Russell.

Le neoformazioni che si vedono nel rene sono costituite dalle stesse cellule di origine mesodermale che costituiscono il tumore principale. Lo stesso deve dirsi dei noduli esistenti nella milza. Anche nei noduli dei reni e della milza vi sono parassiti sotto la forma di corpuscoli di Russell.

Questo tumore per decorso e per struttura è perfettamante identico al primo ed al terzo. Il primo tumore che descrissi in un lavoro precedente (16) fu prodotto dalla inoculazione del *Saccharomyces neoformans* nelle due mammelle posteriori di una cagna. Si svilupparono tumori connettivali nelle due mammelle e noduli nei reni similmente come nell'ultimo caso.

Si deduce quindi che con le inoculazioni dei blastomiceti patogeni negli organi dei cani si possono sviluppare tumori connettivali e tumori epiteliali.

***

L'azione patogena del *Saccharomyces neoformans* è stata studiata anche nei gatti. Di quelli inoculati nel connettivo sottocutaneo alcuni hanno presentato un nodulo nel sito d'inoculazione che, aperto dopo qualche tempo, ha mostrato contenere una sostanza giallicoia, cremosa, contenente leucociti, cellule giganti, detritus calcareo e forme parassitarie del solito aspetto; altri non hanno presentato alcuna lesione.

I gatti inoculati nei testicoli e nelle mammelle neanche hanno presentato lesioni.

Nei gatti inoculati in addome e morti dopo qualche mese, le glandole inguinali ed ascellari erano molto ingrossate; anche ingrossate erano le glandole linfatiche addominali; la milza era ingrandita e mostrava sporgenti sulla superficie i follicoli; nei reni si osservavano dei noduli, di colorito bianco-giallicci; gli stessi noduli si sono osservati alle volte anche nei polmoni; negli altri organi nessuna alterazione.

Con l'esame microscopico a fresco si è constatata la presenza di parassiti solamente nelle glandole linfatiche, nella milza e nel midollo delle ossa. In questi preparati i parassiti si presentavano sotto la forma di globi ialini, riuniti a gruppi, della stessa rifrangenza delle goccioline adipose.

Le colture fatte dagli organi che presentavano lesioni, non hanno dato luogo a sviluppo di parassiti.

Le lesioni degli organi osservate al microscopio appaiono di natura connettivale e sono costituite da cellule epitelioidi simili a quelle che abbiamo riscontrate nei reni del quinto cane, inoculato in prossimità dei testicoli con *Saccharomyces neoformans*.

Nelle sezioni colorate col carminio e col violetto di genziana i parassiti si riscontrano sotto l'aspetto tipico di corpuscoli a fucsina nei cordoni follicolari delle glandole linfatiche e della milza, tra gli elementi linfoidi proliferati del midollo delle ossa, nei noduli dei reni e dei polmoni e sono liberi ed endocellulari. Tale reperto parassitario spiega l'esito negativo delle colture.

Come vedremo in seguito, quando i blastomiceti si presentano sotto la forma di corpuscoli a fucsina, non sono più coltivabili. La ragione della trasformazione dei blastomiceti in corpuscoli fucsinofili risiede nelle proprietà acquistate dal siero di sangue degli animali inoculati, di cui dirò in seguito.

Le pecore inoculate nello addome, nel connettivo sottocutaneo e nelle mammelle non hanno presentato alcuna lesione degna di nota.

***

Da tutte le ricerche innanzi riferite abbiamo acquistato una esatta conoscenza delle forme che i blastomiceti presentano nei tessuti degli animali da esperimento. Queste forme, che sono perfettamente simili a quelle che si riscontrano nei tumori maligni dell'uomo, si possono distinguere in quelle capsulate ed in quelle apparentemente sprovviste di capsule. Nelle prime bisogna considerare la diversa forma della capsula e la diversa disposizione del contenuto protoplasmatico; nelle seconde è da considerare solamente il modo come è disposta la sostanza protoplasmatica, che si colora intensamente coi colori di anilina.

Considerando innanzi tutto la capsula, è da notare che può essere costituita da una o più membrane. La membrana interna, quella che circonda il corpo protoplasmatico del parassita, veduta nei preparati a fresco, appare rifrangente e più o meno spessa. Nei preparati colorati questa membrana rifrangente si colora intensamente coi colori di anilina. Alle volte allo esterno di questa membrana rifrangente ve ne è un'altra più o meno spessa, ialina, la quale è un prodotto di secrezione della membrana interna rifrangente.

La membrana ialina si può facilmente fare comparire in quei blastomiceti che hanno la sola membrana rifrangente, facendo agire su di essi deboli soluzioni acide. A mano a mano che la soluzione acida esercita la sua azione, si vede comparire allo esterno della membrana rifrangente un alone ialino che ingrandisce sempre di più a spese della membrana rifrangente che diventa meno spessa.

Nella spessa membrana ialina alle volte si formano uno, due o più ispessimenti di sostanza fortemente rifrangente la luce, simile a quella che costituisce la membrana interna rifrangente, e si hanno allora quelle forme blastomicetiche ad anelli concentrici, descritte dal Soudakewitch nei cancri e da me riprodotte nei tessuti degli animali con le inoculazioni del *Saccharomyces neoformans*.

Per la formazione della membrana esterna ialina la membrana rifrangente si può ridurre di molto in spessezza, sino a scomparire del tutto.

Nelle forme capsulate il contenuto protoplasmatico o manca del tutto (forme degenerate, involutive) o è scarso e distribuito omogeneamente in tutto il corpo del parassita o è in forma di uno o più granuli o di segmenti periferici, addossati alla membrana rifrangente, o del tutto uniforme ed intensamente colorato. In questo

ultimo caso il contenuto protoplasmatico si confonde con la membrana rifrangente.

Nelle forme blastomicetiche non capsulate il contenuto protoplosmatico si presenta nello stesso modo.

Ai blastomiceti endocellulari o liberi, con contenuto protoplasmatico intensamente ed omogeneamente colorato, con o senza membrana ialiana, disposti a gruppi di due a trenta, il Russell, parecchi anni or sono, diede il nome di corpuscoli a fucsina.

Non si possono confondere i parassiti endocellulari con le inclusioni cellulari.

Se un leucocito penetra nello interno di una cellula epiteliale neoformata, si circonda di un alone chiaro che dapprima piccolo, va poi ingrandendo, fino ad assumere l'aspetto di un grosso vacuolo.

Da principio il leucocito conserva la sua forma normale, ma in seguito va incontro ad un processo di disfacimento, per cui si riduce di molto il corpo cellulare ed il nucleo assume la forma vescicolare. Il leucocito poi continua a disfarsi ed il nucleo si trasforma in un gruppo di granuli giacenti in un residuo del protoplasma cellulare. Può anche scomparire tutta la sostanza cromatica del nucleo ed allora nello interno del grosso vacuolo non si osserva che un residuo del protoplasma cellulare, variamente conformato.

Quando il leucocito è da poco penetrato nello interno di una cellula, non può certo confondersi con un parassita. Ma quando si è ridotto di molto il protoplasma cellulare ed è avvenuta la fusione della sostanza cromatica del nucleo in un globulo giacente nel centro del residuo protoplasmatico del corpo cellulare, un occhio poco esercitato potrebbe confondere questa inclusione cellulare con un parassita giovane, intensamente colorato, circondato da membrana ialina. Facendo però bene attenzione si vede che queste inclusioni cellulari non hanno quella forma regolare che presentano i parassiti.

Neanche si possono confondere coi parassiti endocellulari alcune *degenerazioni che avvengono nel protoplasma delle cellule neoformate.*

Innanzi tutto è da notare che queste forme di degenerazione cellulare non si colorano mai col violetto di genziana, seguendo il metodo di doppia colorazione da me proposto.

Appaiono queste forme di degenerazione come chiazze ialine di diversa forma, con o senza contenuto debolmente colorato. Le chiazze ialine senza contenuto possono essere uniche e multiple, piccole e grandi. Quando sono multiple, possono essere distanti le une dalle altre o strettamente ravvicinate.

Le chiazze ialine non sono mai separate per mezzo di una capsula dal pratoplasma cellulare.

Interessante è anche lo studio delle chiazze ialine con contenuto, che può essere in forma di uno o più granuli ovvero di una massa debolmente colorata, provveduta qualche volta di prolungamenti. Alcune degenerazioni ialine, contenenti un granulo al centro, sono state descritte dagli osservatori che mi hanno preceduto, come parassiti endocellulari.

Distinte le forme parassitarie dalle inclusioni cellulari e dalle degenerazioni del corpo cellulare, bisogna dire della ragione per la quale i blastomiceti si trasformano nell'organismo in corpuscoli di Russell. Questi ritenne i corpuscoli a fucsina per parassiti e giustamente li classificò tra i blastomiceti, senza però dare la dimostrazione di ciò che egli affermava.

In precedenti lavori avevo dimostrato che inoculando colture pure di blastomiceti patogeni nello addome dei gatti (17) si riproducevano costantemente i tipici corpuscoli fucsinofili nella milza, nelle glandole linfatiche e nel midollo delle ossa.

Non ostante questi miei lavori, alcuni osservatori hanno continuato ad affermare che i corpuscoli di Russell sono prodotti di degenerazione cellulare e che non hanno nulla a che fare con la genesi dei tumori maligni.

Ed a confermare le osservazioni degli oppositori contribuirono non poco le ricerche del Gonella e del Guarnieri, i quali riscontrarono i corpuscoli di Russell nella congiuntivite tracomatosa, del De Simoni che trovò gli stessi corpuscoli nelle tonsille ipertrofiche, del Mazza, il quale li trovò costantemente nel rinoscleroma, del Secchi che li descrisse nell'acne cheloide e di altri osservatori che li riscontrarono in altri tessuti patologici.

Nei lavori innanzi citati io aveva affermato un fatto in base degli esperimenti d'inoculazione, ma non ne aveva trovato la ragione. Era quindi logico che gli oppositori avessero continuato ad affermare che i corpi fucsinofili erano prodotti di degenerazione cellulare (mucosa, pseudomucosa, amiloide, albuminosa, ecc.) o prodotti di alterazione del nucleo (ipercromatolisi, cariolisi, cariogenesi, metacromasia).

Dopo molte ricerche ho trovato che *la causa della trasformazione dei blastomiceti in tipici corpuscoli fucsinofili risiede nelle proprietà speciali del siero di sangue degli animali inoculati.*

Inoculando il siero di sangue dei cani immunizzati con le proteine dei blastomiceti nelle vene dei gatti contemporaneamente alle

colture virulenti dei blastomiceti patogeni, mi accorsi che la morfologia dei parassiti nei tessuti era diversa da quella che si osservava in seguito alla inoculazione endovenosa dei soli blàstomiceti patogeni.

In questi ultimi anni mi è riuscito di immunizzare alcuni cani contro la inoculazione endovenosa di colture virulenti del *Saccharomyces neoformans* e del blastomicete patogeno isolato dal Plimmer e da lui gentilmente inviatomi.

La immunizzazione dei cani riesce abbastanza facilmente inoculando loro nel connettivo sottocutaneo o nella cavità addominale, più volte nel corso di parecchi mesi, le proteine blastomicetiche.

Se a questi cani trattati nel modo detto innanzi, s'inoculano in vena colture virulenti di blastomiceti patogeni, non si osserva alcun che di anormale.

Il siero di sangue di questi cani inoculato anche in quantità considerevole nelle vene dei gatti contemporaneamente al *Saccharomyces neoformans* o al blastomicete isolato dal Plimmer non ha la proprietà di salvarli dalla morte.

Il reperto anatomo-patologico dei gatti morti in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni e di siero di cani immunizzati non è diverso da quello che si osserva nei gatti morti in seguito ad inoculazione endovenosa di soli blastomiceti patogeni. Diversa solamente è la morfologia dei parassiti.

Mentre nei gatti inoculati in vena con i soli blastomiceti patogeni, questi si presentano sotto la forma capsulata, nei gatti inoculati in vena con siero di sangue di cani immuni e con blastomiceti patogeni sono ordinariamente scarsi i parassiti capsulati e sono invece numerosi i parassiti con contenuto omogeneo, intensamente colorato, e quelli che si presentano sotto la forma tipica di corpuscoli a fucsina (Fig. 4).

L'azione che il siero di sangue dei cani immunizzati esercita sui blastomiceti esistenti negli organi dei gatti è indiretta e non diretta, nel senso che il siero agisce sugli elementi cellulari e li stimola a produrre una sostanza che ne modifica la forma. Infatti se si prendono dei blastomiceti dai tessuti dei gatti e si pongono nel siero di sangue dei cani immunizzati non si verifica, neanche dopo parecchi giorni, alcuna modificazione nella forma dei parassiti.

I corpuscoli di Russell sono specialmente abbondanti nel midollo delle ossa, nella milza e nelle glandole linfatiche, ma se ne rinvengono anche in numero discreto nei reni, nel fegato e nei polmoni.

Il fenomeno della trasformazione dei blastomiceti in corpuscoli a

fucsina è analogo a quello che si verifica per alcuni batteri e che porta il nome di batteriolisi ed è perciò che è giusto denominarlo saccaromicetolisi o blastomicetolisi.

La sostanza esistente nel siero di sangue degli animali immunizzati contro i blastomiceti, capace di produrre tale trasformazione, va classificata tra gli anticorpi, accanto alla sostanza battericida, agglutinante, ecc.

Se nei gatti inoculati in addome con cultura di blastomiceti patogeni e morti dopo alcuni mesi si rinvengono soli corpuscoli a fucsina, ciò vuol dire che, morti alcuni dei parassiti, con le loro proteine hanno provocato una reazione da parte delle cellule dell'organismo, con la formazione nel siero di sangue della sostanza saccaromicetolitica, la quale ha trasformato i restanti parassiti in corpuscoli a fucsina.

Vediamo ora come spiegare l'azione di questa sostanza saccaromicetolitica sui blastomiceti.

Bisogna innanzi tutto ammettere una azione di questa sostanza sulla capsula dei blastomiceti, ciò che si deduce dal potere che acquista la membrana esterna ialina di assumere il colore di anilina, in guisa da non distinguersi più nettamente dalla membrana interna rifrangente.

Bisogna poi ammettere che la sostanza saccaromicetolitica agisca sul contenuto protoplasmatico, producendo la cromatolisi, ciò che si rileva dalla fusione avvenuta nella sostanza cromatica e dalla omogenea distribuzione di essa in tutto il corpo del parassita.

In ultimo la sostanza cromatica si fonde con la capsula ed assume l'aspetto tipico di corpuscolo a fucsina.

In questo stadio i corpuscoli a fucsina sono metacromatici, in quanto assumono col violetto di genziana una tinta alquanto diversa da quella dei parassiti normali.

Modificata la capsula, avvenuta la cromatolisi della sostanza cromatica del corpo del parassita e la sua fusione con la capsula, comincia la frammentazione delle masse cromatiche che somiglia ad un processo di gemmazione, in quanto dalla periferia di una grande massa cromatica si staccano piccole masse, le quali o rimangono per qualche tempo aderenti alla massa, da cui hanno avuto origine, o si staccano e sono inglobate dagli elementi cellulari.

Il fenomeno della saccaromicetolisi somiglia molto a quello della cariolisi.

Si potrebbe anche pensare ad un altro meccanismo di forma-

zione dei corpuscoli di Russell, ammettendo che, modificata la membrana dei parassiti dalla sostanza saccaromicetolitica ed avvenuta la cromatolisi della sostanza protoplasmatica del corpo del parassita, questa fuoriesca poco per volta attraverso la membrana modificata e dia luogo alla formazione dei tipici corpuscoli a fucsina.

Per ammettere questa seconda ipotesi bisognerebbe trovare nei tessuti molte capsule blastomicetiche vuotate del loro contenuto, ciò che non si verifica.

I corpuscoli a fucsina non sono blastomiceti vivi e le forme di riproduzione che essi mostrano sono false gemmazioni. Si spiegano a questo modo tutti i risultati negativi da me ottenuti praticando le colture dal midollo delle ossa, dalla milza e dalle glandole linfatiche dei gatti morti in seguito ad inoculazione contemporanea di siero di sangue di cani immunizzati e di colture di blastomiceti patogeni.

Dapprima io credeva che fossero forme di blastomiceti adattate a vivere solamente nell'organismo ed incapaci di riprodursi nei terreni artificiali di nutrizione. In questi ultimi anni mi sono convinto che si tratta di forme incapaci di riprodursi non solo nei terreni di nutrizione, ma anche nell'organismo. Infatti ho inoculato emulsioni in acqua sterile di milza e di midollo delle ossa appartenente ai gatti morti in seguito ad inoculazione endovenosa di siero di sangue di cani immuni e di blastomiceti patogeni e contenente soli corpuscoli a fucsina nelle vene di gatti, cani, cavie e conigli e finora non ho osservato alcun che di anormale negli animali inoculati.

Sappiamo che, nell'organismo sano esistono numerosi blastomiceti e ricerche fatte in proposito hanno dimostrato che se ne trovano sulla cute, sulla mucosa boccale, intestinale, vaginale, ecc. Ora per lesioni avvenute sulla cute e sulle mucose questi blastomiceti possono penetrare nei tessuti e dar luogo dopo la loro morte alla formazione della sostanza saccaromicolitica, la quale trasformerebbe in corpuscoli a fucsina i blastomiceti ancora vivi. Non sarebbe quindi strano di rinvenire corpuscoli a fucsina in un organismo sano.

Già si sa che in tessuti patologici dell'uomo diversi dai tumori maligni si rinvengono corpuscoli a fucsina. Finchè ricerche rigorose non abbiano dimostrato che con la inoculazione di colture pure di blastomiceti si possono produrre simili lesioni anatomo-patologiche, non siamo autorizzati a ritenere che quei corpuscoli a fucsina sieno la causa della lesione e possiamo ritenere invece che essi

sieno quelli accidentali della cute e delle mucose che, penetrati nei tessuti, abbiano dato luogo alla formazione dell'anticorpo e si sieno trasformati iu corpuscoli fucsinofili.

Assodato il fatto che nel siero di sangue degli animali trattati con le proteine dei blastomiceti patogeni esiste un anticorpo capace di trasformare i parassiti in tipici corpuscoli fucsinofili, era necessario vedere, se inoculando agli animali le proteine dei blastomiceti non patogeni, si formava nel siero di sangue lo stesso anticorpo.

Per queste ricerche sono state utilizzate colture di blastomiceti non patogeni isolati dall'aria. Le proteine di questi blastomiceti sono state ripetutamente inoculate nel connettivo sottocutaneo dei cani nel corso di due, tre e più mesi.

Si è poi raccolto il siero di sangue di questi cani e si è inoculato nelle vene dei gatti contemporaneamente al blastomicete, la cui proteina era servita per preparare il cane.

Dopo parecchi giorni si sono ammazzati i gatti e si sono fatti preparati da tutti gli organi. Nelle sezioni di tutti gli organi si sono riscontrati corpuscoli a fucsina, più abbondanti nella milza, nel midollo delle ossa, nelle glandole linfatiche; meno abbondanti nei reni, nei polmoni e nel fegato.

Sicchè in base al risultato di questi esperimenti si può affermare che *non solamente le proteine dei blastomiceti patogeni, ma anche quelle dei blastomiceti non patogeni sono capaci di dar luogo alla formazione di un anticorpo, capace di produrre la saccaromicetolisi, trasformando i blastomiceti in corpuscoli a fucsina.*

Nei tumori maligni a lungo decorso, come ha dimostrato il Binaghi (18) i blastomiceti si trovano sempre sotto la forma di corpuscoli a fucsina e si spiega quindi la impossibilità di ottenere in questi casi le colture dei parassiti.

Solamente in quei tumori maligni dell'uomo, nei quali la sostanza saccaromicetolitica del siero di sangue non ha ancora trasformati tutti i parassiti in corpuscoli a fucsina, è possibile ottenere le colture.

Se, riscontrando nei tumori maligni dell'uomo soli corpuscoli fucsinofili, riteniamo che essi sieno la causa della lesione, è perchè persone degne di fede (Plimmer-Leopold) hanno ottenuto colture di blastomiceti dai carcinomi dell'uomo e perchè con colture pure di blastomiceti patogeni si sono riprodotti tumori epiteliali e connettivali nei cani (Sanfelice).

Non possono quindi alle lesioni anatomo-patologiche prodotte dai blastomiceti patogeni applicarsi i criteri stabiliti dal Koch per ritenere un parassita causa di una data infezione.

Innanzi tutto non è un criterio per ritenere patogeno un blastomicete il trovare in alcuni tessuti costantemente delle forme blastomicetiche sotto forma di corpuscoli a fucsina, perchè la loro presenza può essere accidentale.

In secondo luogo sappiamo che, quando i blastomiceti si trovano nei tessuti sotto forma di corpuscoli di Russell, non sono più coltivabili e perciò il non ottenere la coltura non è una ragione per negare che essi sieno causa di un dato processo patologico.

Dopo quanto ho esposto appare chiaro quale è il *destino dei blastomiceti inoculati nell'organismo.*

Indubbiamente una parte di essi si elimina attraverso i reni. Negli animali morti in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti si riscontrano quasi costantemente nei glomeruli e nei canalini uriniferi molti blastomiceti.

Dei blastomiceti che rimangono nell'organismo, alcuni muoiono e danno con le proteine la reazione da parte del siero di sangue, il quale poco per volta trasforma i blastomiceti vivi in corpuscoli a fucsina.

I blastomiceti nell'organismo possono anche subire la degenerazione calcarea dovuta al deposito di fosfato di calce nella membrana esterna. È tutt'altro che raro riscontrare nei reni dei gatti, dei cani, dei conigli e delle cavie, morte in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni, masse calcaree più o meno grandi dovute alla degenerazione calcarea da cui sono stati colpiti gruppi di parassiti.

Nel siero di sangue degli animali resi immuni contro la infezione blastomicetica e di quelli con infezione in atto ho ricercato la sostanza sensibilizzatrice.

Dalle ricerche di Bordet e Gengou (19) sappiamo che la proprietà batteriolitica e citolitica di un siero proviene da un anticorpo specifico chiamato sostanza sensibilizzatrice dal Bordet, Immunkörper dall'Ehrlich, sostanza fissatrice o fissatore dal Metschnikoff.

Il siero di sangue di un cavallo immunizzato contro il bacillo della peste contiene una sostanza sensibilizzatrice che conferisce al bacillo della peste la proprietà di fissare l'alessina.

Nella prima serie di ricerche mi sono servito di cani che erano stati immunizzati contro il *Saccharomyces neoformans* e contro il blastomicete patogeno isolato dal Plimmer.

Tutti i cani furono immunizzati con ripetute inoculazioni di proteine blastomicetiche nel connettivo sottocutaneo.

Il primo cane della serie fu inoculato la prima volta con le proteine blastomicetiche il 22 dicembre 1900.

Dopo circa un anno di trattamento fu inoculato in vena giugulare con una coltura virulenta di *Saccaromyces neoformans* e superò la infezione.

Il secondo cane fu trattato con le stesse proteine blastomicetiche dal 25 gennaio di quest'anno fino al 30 aprile. Anche questo secondo cane superò la inoculazione endovenosa di colture virulenti.

Il terzo cane fu trattato con le proteine del blastomicete isolato dal Plimmer. Anche questo cane fu inoculato in vena con la coltura virulenta e non morì.

Il quarto cane fu trattato con le stesse proteine ed in otto mesi ebbe venti inoculazioni sottocutanee.

Anche questo cane superò la inoculazione endovenosa della coltura virulenta.

Nella seconda serie di ricerche mi sono servito di gatti e conigli che con lo stesso metodo erano stati immunizzati contro i blastomiceti patogeni.

Oltre allo studio delle proprietà del siero di sangue degli animali immunizzati ho fatto anche quello degli animali con infezione in atto.

A questo scopo s'inocularono colture virulenti di *Saccharomyces neoformans* e del blastomicete patogeno isolato dal Plimmer nelle vene di cani, gatti e conigli e quando dopo qualche tempo apparvero i sintomi della infezione si raccolse il siero di sangue per lo studio degli anticorpi.

Si raccolse il sangue da quattro cani con infezione in atto, di cui due furono inoculati in vena con colture di *Saccharomyces neoformans* e due con il blastomicete del Plimmer. Il siero dei primi due fu raccolto dopo 35 e 40 giorni; quello degli altri due dopo 38 e 45 giorni.

Pochi giorni dopo il salasso morirono i quattro cani con il reperto anatomo-patologico caratteristico della infezione blastomicetica diffusa.

Dei tre gatti con infezione in atto da cui fu raccolto il siero di sangue per lo studio degli anticorpi, il primo fu inoculato in vena con coltura di *Saccharomyces neoformans*, gli altri due con il blastomicete isolato dal Plimmer. Il salasso fu fatto dopo 20, 30 e 82 giorni dalla praticata inoculazione. Anche questi 3 gatti morirono pochi giorni dopo praticato il salasso con infezione blastomicetica diffusa.

Tre conigli inoculati in vena giugulare con colture di *Saccharomyces neoformans* furono salassati dopo 20, 25 e 30 giorni dalla praticata inoculazione.

Ora dirò del metodo seguito per lo studio degli anticorpi secondo quanto hanno consigliato il Bordet ed il Gengou.

Innanzitutto ho preparato il siero emolitico inoculando nel connettivo sottocutaneo di un coniglio nel corso di 15-20 giorni quindici centimetri cubici di sangue di pollo. Se il siero di coniglio si aggiunge alla emulsione in liquido fisiologico delle emazie di pollo, queste sono in breve tempo distrutte.

Si riscalda il siero emolitico di coniglio per 1/2 ora a 56° C e si aggiunge nella dose di 20 gocce a dieci gocce della emulsione di emazie di pollo in liquido fisiologico.

D'altra parte si preparano emulsioni di *Saccharomyces neoformans* e del blastocimete del Plimmer in liquido fisiologico e ad otto gocce di queste emulsioni si aggiungono 24 gocce del siero degli animali immuni o degli animali con infezione in atto riscaldato 1/2 ora a 56° C e 4 gocce di siero normale di cane, gatto, coniglio immune o con infezione in atto.

Cinque a sei ore dopo la preparazione di questi miscugli si aggiunge a ciascuno una goccia del miscuglio di siero di coniglio emolitico riscaldato e di emazie di pollo.

Per controllo si preparano anche dei miscugli nei quali il siero riscaldato degli animali immuni o con infezione in atto è sostituito dal siero normale riscaldato della stessa specie animale.

Se i blastomiceti sono sensibilizzati da un anticorpo specifico, assorbono e fissano l'alessina ed allora il miscuglio non contenendo più alessina libera, non distrugge più le emazie di pollo.

Se al contrario il siero degli animali immuni e di quelli con infezione in atto non contiene una sostanza sensibilizzatrice per i blastomiceti, si unisce l'alessina rimasta libera con la sostanza sensibilizzatrice del siero di coniglio emolitico e le emazie di pollo sono distrutte.

Dalle numerose ricerche fatte risulta che *nel siero di sangue degli animali immuni esiste una sostanza sensibilizzatrice* e però le emazie di pollo rimangono intatte.

Prima di me il Malvoz (20) ha fatto una serie di esperienze ed è venuto alla medesima conclusione.

Non esiste al contrario nel siero degli animali con infezione in atto la sostanza sensibilizzatrice e perciò le emazie di pollo sono distrutte.

Questo metodo mi ha permesso di predire se i cani ed i conigli inoculati in vena con colture di blastomiceti patogeni sarebbero morti oppur no. Infatti ogni volta che ho constatato nel siero di sangue la presenza della sostanza sensibilizzatrice, gli animali hanno sopravvissuto ed ogni volta che nel siero di sangue non ho constatato la presenza di detta sostanza, gli animali sono morti.

Recentemente il Brauha (21) ha ricercato gli anticorpi nel siero di sangue degli individui ammalati di cancro ed è venuto alla conclusione che nel siero non esiste sostanza sensibilizzatrice per i blastomiceti ritenuti causa della lesione. Da ciò nega la importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni. Ora se egli avesse fatto esperimenti negli animali con infezione in atto, avrebbe visto che l'*assenza di sostanza sensibilizzatrice nel siero degli individui affetti da cancro invece d'infirmare conferma la importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni.*

In altro lavoro riferirò sulle altre proprietà del siero di sangue degli animali immunizzati contro i blastomiceti patogeni.

IV.

Inoculazioni dei blastomiceti nelle vene.

Le inoculazioni endovenose dei blastomiceti patogeni danno risultati positivi con maggiore frequenza che non le inoculazioni negli organi.

Alcuni dei cani inoculati in vena giugulare con il *Saccharomyces neoformans* sono morti dopo 15-20 giorni, altri dopo uno, due e tre mesi.

In genere tutti gli animali, parecchi giorni dopo la inoculazione, hanno presentato un notevole dimagramento.

Le lesioni che presentano i cani alla autopsia possono essere diffuse a quasi tutti gli organi ovvero limitate ad alcuni organi solamente.

Di tutti i cani inoculati in vena solamente uno ucciso dopo alcuni mesi ha presentato un tumore nella milza.

I cani morti con infezione diffusa presentano ingrossate le glandole linfatiche ascellari ed inguinali; la milza alquanto ingrandita con i follicoli linfatici sporgenti sulla superficie; le glandole linfatiche addominali considerevolmente ingrandite; nei reni, specialmente nella sostanza corticale, si osservano molti noduli di colorito bianco-giallastro; nel fegato qualche volta anche si osservano dei piccoli noduli, i polmoni presentano noduli piuttosto piccoli, di colorito grigiastro, su tutta la superficie; simili lesioni si vedono nel miocardio, nella sostanza corticale del cervello, nella pia meninge, nella retina.

I cani che muoiono in preda a questa infezione diffusa, oltre al considerevole dimagramento, barcollano nel camminare, spesso cadendo da un lato e non vedono per l'avvenuto intorbidamento della cornea.

Tutti questi disturbi si spiegano con le lesioni dovute alle localizzazioni dei parassiti nel sistema nervoso centrale e nell'occhio.

Facendo colture da tutti gli organi che presentano lesioni, costantemente si hanno risultati positivi. Nei preparati a fresco fatti per dilacerazione da tutti gli organi che presentano lesioni si osservano scarse forme parassitarie. Il più delle volte bisogna ripetere più volte il preparato per poter vedere alcuni parassiti.

Le forme parassitarie hanno ordinariamente lo stesso aspetto di quelle che si vedono nell'organismo della cavia, del coniglio e del ratto bianco; sono rotonde, di varia grandezza con una membrana rifrangente a doppio contorno e con uno o più grandi rifrangenti nello interno. La membrana rifrangente, variamente spessa, solamente in alcuni parassiti è circondata da un'altra membrana ialina a doppio contorno.

Di queste forme parassitarie alcune sono libere ed altre endocellulari.

Nelle sezioni delle glandole linfatiche si osserva un considerevole ingros-

samento dei follicoli linfatici e dei cordoni follicolari. Negli spazi linfatici si nota un leggiero aumento degli elementi linfoidi. Le forme parassitarie, piuttosto scarse, si riscontrano solamente nei cordoni follicolari e sono o libere o endocellulari simili a quelle che si osservano nei tessuti delle cavie e dei conigli. Non si vedono tipici corpuscoli a fucsina.

Nella milza i follicoli linfatici ed i cordoni follicolari sono considerevolmente ingrossati. In questi ultimi solamente si notano parassiti.

Il midollo delle ossa lunghe è molto ricco di elementi linfoidi ed ordinariamente contiene scarse forme parassitarie.

I reni presentano lesioni più importanti. Tanto nella parte corticale che in quella midollare, vi sono dei noduli costituiti da cellule epitelioidi grandi con nucleo ovale, colorato debolmente, e protoplasma relativamente grande. Tra queste cellule vi sono scarsi leucociti. In mezzo a questi accumuli di cellule si vedono alle volte dei glomeruli normali e dei canalini uriniferi, le cui cellule epiteliali contengono spesso goccioline adipose. In alcuni glomeruli vi è un essudato costituito da cellule endoteliali e da leucociti. Non è raro riscontrare dei parassiti nelle anse glomerulari e nella capsula del Bowmann. Forme parassitarie piuttosto scarse si vedono nei noduli costituiti dalle cellule epitelioidi, libere o endocellulari.

Nel fegato i vasi capillari sono dilatati e contengono numerosi leucociti. Tra le cellule epatiche si riscontrano alle volte dei noduli miliari, i quali sono costituiti da grosse cellule rotonde con nucleo grande, debolmente colorato.

I noduli del cervello, della retina, delle meningi, dei polmoni presentano la medesima struttura.

Che il processo infettivo determinato nei cani con la inoculazione in vena del blastomicete patogeno sia realmente dovuto al parassita inoculato, non credo vi possa essere dubbio alcuno, per la ragione che con le colture ottenute dagli organi di un cane si possono riprodurre in altri cani le medesime lesioni.

Solamente il Busse negò che le lesioni fossero dovute ai blastomiceti patogeni inoculati. Lo Sternberg nel suo ultimo lavoro dichiara irragionevole l'affermazione del Busse, come già io feci in un precedente lavoro.

Le neoformazioni prodotte nei cani con le inoculazioni endovenose del *Saccharomyces neoformans* sono di natura connettivale.

Questo fatto è stato confermato completamente dallo Sternberg (22). Come ho già detto innanzi siamo discordi nella interpretazione delle lesioni.

Mentre lo Sternberg crede che si tratti di un tessuto di granulazione del tutto speciale, io credo che si tratti di lesioni di natura neoplastica.

Le lesioni prodotte nei cani hanno molta somiglianza con quelle osservate da Busse negli organi della donna morta in seguito a

sarcoma molle della tibia. Il Busse trovandosi innanzi ad un caso nuovo, prodotto da un parassita nuovo, ha voluto interpretarlo con le comuni e scolastiche nozioni di anatomia patologica e però lo ha battezzato per una forma di piemia. Si noti però che la lesione primitiva della tibia, da valenti chirurgi dal lato clinico e dallo stesso Busse dal lato istologico, era stata diagnosticata per una forma di sarcoma molle, per una lesione cioè di natura neoplastica. Ora o il Busse ha errato prima o ha errato dopo. Io credo che abbia preso un grave errore dopo, considerando come una forma di piemia una forma di sarcomatosi diffusa.

Praticando inoculazioni endovenose nei cani si hanno multiple localizzazioni dei pasassiti e quindi multiple neoformazioni, ma praticando inoculazioni in organi si possono avere dei casi simili a quello osservato dal Busse, cioè a dire tumore connettivale nel sito primitivo d'inoculazione e consecutiva diffusione negli organi, Il decorso è più rapido quando la inoculazione si pratica nelle vene, meno rapido quando la inoculazione si pratica negli organi.

Alcuni cani morti in seguito alla inuculazione endovenosa dei blastomiceti patogeni non hanno presentato alla sezione lesioni diffuse in tutti gli organi, ma solamente nei reni e qualche volta nella milza. Questi reperti anatomo-patologici sono certamente da distinguersi nettamente da quelli innanzi descritti. Nelle milze di alcuni di questi cani alle volte ho osservato dei noduli della grandezza di piccole nocciuole.

Le lesioni istologiche notate nei reni e nella milza di questi cani sono perfettamente identiche a quelle che si riscontrano nei cani morti con infezione diffusa.

In un mio precedente lavoro (23) pubblicato intorno all'azione patogena dei blastomiceti, a proposito dei risultati ottenuti con le inoculazioni endovenose del *Saccharomyces neoformans* mi esprimeva nel modo seguente: « Certo si è che se i cani inoculati in vena col *Saccharomyces neoformans*, invece di morire dopo un mese, un mese e mezzo, fossero morti della stessa infezione dopo otto, dieci mesi (e son sicuro che di questi casi me ne capiteranno) avrebbero presentato delle lesioni connettivali molto più estese, con parassiti non più coltivabili. »

Ciò che io prevedeva è accaduto in uno dei cani inoculato in vena giugulare con coltura pura del *Saccharomyces neoformans* ed ucciso dopo sei mesi e mezzo, perchè apparentemente non presentava nulla di anormale, ad eccezione di un discreto dimagramento.

Alla sezione non si trovò altro che un tumore nella milza.

Il tumore veduto dalla parte ventrale della milza era del volume e della forma di una castagna e veduto dalla parte dorsale era distinto in due parti, di cui una sferica, della grandezza di una ciliegia, l'altra costituita da due noduli, l'uno più grande, l'altro più piccolo, riuniti fra loro da un istmo abbastanza grosso.

Il tumore appariva dello stesso colorito della milza normale, tranne in alcune parti, di colorito rosso scuro.

Quanto alla consistenza, il tumore era piuttosto molle.

Nella sezione il tumore appariva costituito di un tessuto compatto, senza alcuna delimitazione fra le diverse parti che lo costituivano.

Dalle diverse parti del tumore furono praticate colture, ma non si ebbero risultati positivi.

Il tumore è costituito da cellule con nuclei grandi e debolmente colorati, perfettamente simili alle cellule linfoidi, che costituiscono la parte principale della polpa splenica.

Tra i gruppi di cellule costituenti il tumore vi sono spazi più o meno grandi riempiti di globuli rossi.

Sparse fra le cellule del tumore si vedono masse più o meno grandi di pigmento bruno.

Là dove sono grandi accumuli di corpuscoli rossi si osservano cellule in via di disfacimento con residui di cromatina.

Nelle sezioni degli organi non si riscontrò alcuna lesione.

Nel tumore vi sono parassiti endocellulari e liberi sotto forma di corpuscoli a fucsina.

La forma che i parassiti presentano nel tumore spiega il risultato negativo delle colture.

Quanto alla natura del tumore credo possa affermarsi con certezza che si tratta di un sarcoma.

Sono stati descritti fibromi, angiomi e sarcomi della milza. I sarcomi primitivi sono piuttosto rari, ma ne esistono descrizioni nella letteratura, tra le quali mi piace ricordare quella del Weichselbaum (24).

I gatti e le pecore morte in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni hanno presentato le stesse lesioni dei cani.

Nei tessuti di tutti gli animali morti dopo breve tempo e con localizzazioni multiple in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni non si riscontrano i parassiti sotto la forma di corpuscoli a fucsina. Probabilmente ciò dipende dal fatto che gli animali muoiono prima che nel siero di sangue si sia formata la quantità di sostanza saccaromicetolitica necessaria per produrre la trasformazione dei parassiti.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA II.

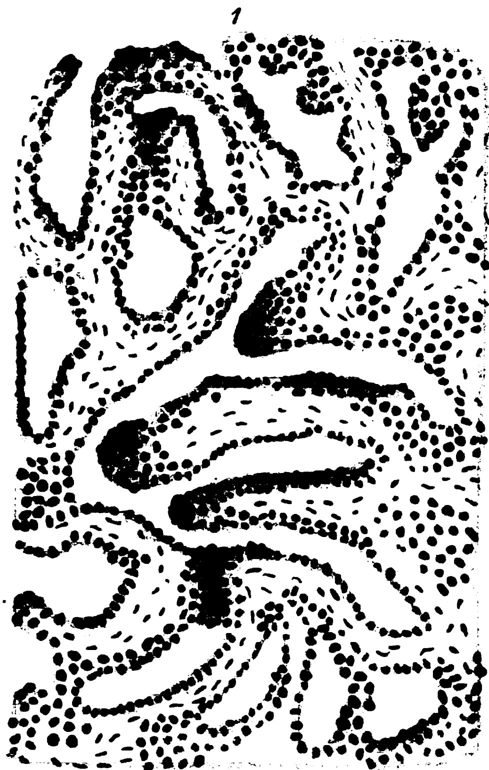
FIG. 1. Sezione del tumore prodotto nella glandola mammaria di una cagna con la inoculazione del *Saccharomyces neoformans*. Oc. 4. Ob. A. Zeiss.

FIG. 2. Sezione della parte periferica dello stesso tumore. Oc. 3. Ob. C. Zeiss.

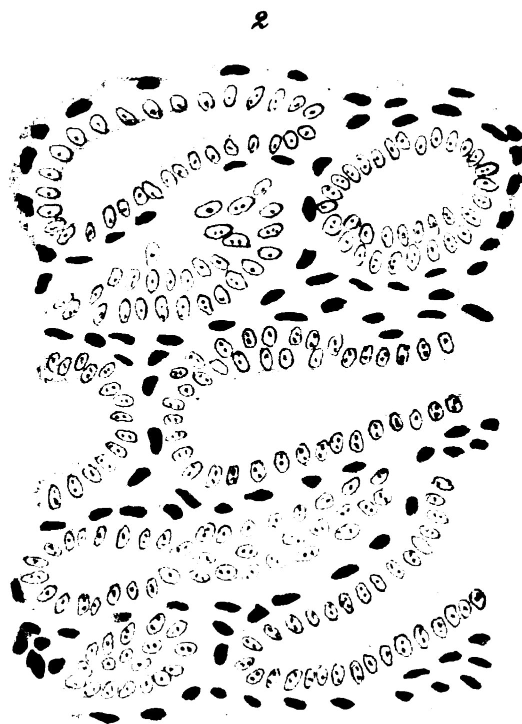
FIG. 3. Sezione di una glandola linfatica inguinale della stessa cagna con metastasi cancerigna. Oc. 3. Ob. C. Zeiss.

FIG. 4. Sezione di midollo del femore di gatto morto in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomicete patogeno (*Saccharomyces neoformans*) e di siero di cane trattato con le proteine dello stesso blastomicete. Si osserva la saccaromicetolisi dei parassiti fino alla formazione dei tipici corpuscoli di Russell, liberi ed endocellulari. Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

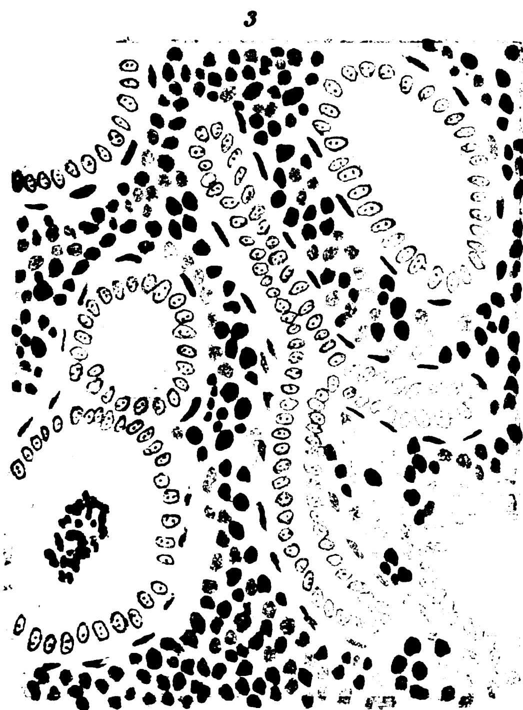
1



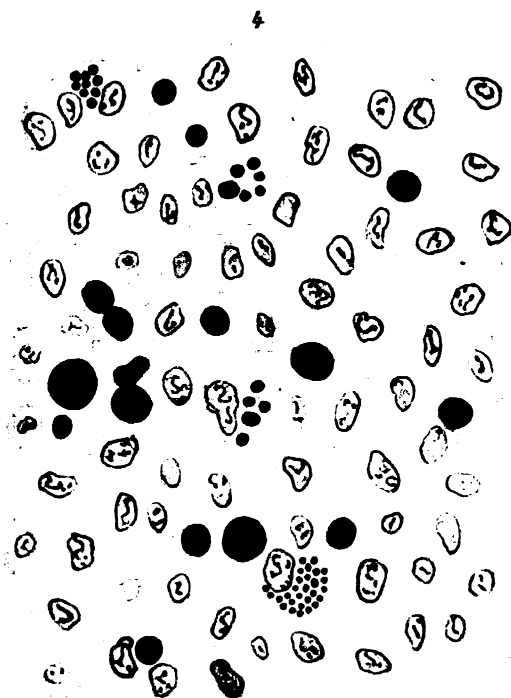
2



3



4



Sanfelice dis.

Lit Saiussolia

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Sui metodi di ricerca comuni al bacillo del tifo e ai bacilli della dissenteria

per il dott. **F. TUSINI.**

Dopo la scoperta del bacillo di Eberth nelle infezioni tifose diversi osservatori hanno cercato dei metodi che servissero alla diagnosi di questo germe. I primi studi sul proposito diedero come caratteristici la grandezza del germe, la sua mobilità, le colonie sulle piastre di gelatina, lo sviluppo su patate, la sua azione patogena verso gli animali sicchè sino a poco tempo fa, niuno dubitava che un germe piuttosto lungo e sottile, mobile, formante la colonia a piatto cosidetta a montagna di ghiaccio o a foglia di vite sviluppantesi impercettibilmente sulle patate, patogeno per cavie e conigli, non fosse il b. di Eberth. Quando però si trovarono nell'ambiente e specialmente nelle acque dei germi simili sebbene non patogeni per gli animali, sorsero dei dubbi sulla identificazione in base ai caratteri sopraccennati. Si pensò allora di mettere in rilievo i caratteri biologici del germe e poichè era recente la scoperta di un altro microorganismo diffusissimo nell'ambiente ad esso molto simigliante che si trova pure nell'intestino degli individui sani, il b. *coli*, la ricerca dei caratteri biologici venne specialmente diretta al differenziamento di questi due germi. Si studiarono così le proprietà fermentative dell'uno e dell'altro, quindi l'azione sugli zuccheri, la capacità di produrre degli acidi nelle culture, la proprietà di decolorare i mezzi di nutrizione, ecc. Tali ricerche condussero a separare con una certa nettezza i due germi l'uno dall'altro quando posseggano caratteri tipici ma lasciarono sempre dei dubbi in rapporto a germi che hanno caratteri misti che si riuniscono nel gruppo dei similtifi. Allora su questi similtifi conversero gli studi degli autori; dapprima

si riconobbe l'esistenza di un solo similtifo ma poi il numero ne crebbe a tal punto che il solo Pellegrini ad es. nelle acque di Pisa ne trovò 75. A questi si deve appunto il primo tentativo di differenziazione in gruppi di tali batteri che riunì nelle seguenti sei categorie:

1. Germi che coagulano il latte, con reazione dell'indolo, sviluppo di patina abbondante nella patata ed arrossamento del brodo di Wurtz.
2. Germi che coagulano il latte, sviluppo di patina abbondante nella patata, nessun arrossamento.
3. Germi che coagulano il latte, sviluppo tipico del tifo nella patata, nessun arrossamento.
4. Germi che coagulano il latte con reazione negativa dell'indolo, sviluppo di abbondante patina nella patata, nessun arrossamento.
5. Germi che coagulano il latte con reazione negativa dell'indolo, sviluppo tipico del bacillo del tifo nella patata ed arrossamento del brodo di Wurtz.
6. Germi che non coagulano il latte, con reazione dell'indolo, sviluppo di patina abbondante nella patata, nessun arrossamento.
7. Germi che non coagulano il latte, con reazione dell'indolo, sviluppo tipico del bacillo del tifo nella patata, nessun arrossamento.
8. Germi che non coagulano il latte, reazione negativa dell'indolo, sviluppo tipico del bacillo del tifo nella patata, bacillo di Eberth.

In questo Istituto un tentativo di differenziamento fu fatto dal Casagrandi in base ai principali caratteri culturali e biologici. Da questo studio risulta la possibilità di stabilire una continuata catena di gruppi di forme riunenti Tifo e Coli, gli anelli estremi della quale sono rappresentati dal tipo Eberth e dal tipo Escherich così:

TIFO

1° Similtifi mai gasogeni con tutti i caratteri del tifo ma con reaz. indolo positiva.
2° Similtifo mai gasogeni con reaz. indolo positiva e con sviluppo rigoglioso su patate.
3° Similtifi o similcoli ora gasogeni ora no con i tutti caratteri del tifo.
4° Similtifi o similcoli ora gasogeni ora no ma senza reazione dell'indolo, senza arrossamento del brodo di Wurtz, senza coag. il latte, con abbondante sviluppo su patate.

COLI

1° Colisimili con tutti i caratteri del coli ma senza arrossare il brodo di Wurtz.
2° Colisimili ma senza arrossare il brodo di Wurtz e con deficiente sviluppo su patata.
3° Similcoli o similtifi ora gasogeni ora no con tutti i caratteri del coli.
4° Colisimili o similtifi ora gasogeni ora no ma senza produrre indolo con sviluppo deficiente su patate.

In questi ultimi tempi poi per differenziare il b. di Eberth si pensò di ricorrere al criterio siero-diagnostico. Fu così possibile al Valenti di mostrare la identità di certi similtifi col b. di Eberth ed al Casagrandi riuscì di trovare una stretta parentela tra tifi e certi germi saprofiti esistenti nell'ambiente. Però il b. del tifo può perdere la proprietà di venire agglutinato quando ad esempio sia passato per animali fortemente immunizzati o sia stato tenuto nel siero di tali animali e si trovi quindi in condizioni da non produrre sieri agglutinanti.

La questione però che nella pratica preoccupa ancora gli autori è il procedimento da seguire per ricercare ed isolare il b. di Eberth in mezzo agli altri e a quelli che più lo assomigliano. I metodi di ricerca sinora indicati si può dire che cadono successivamente quando vengono controllati od almeno essi perdono i caratteri di specificità indicati dall'autore, ed è per questo che generalmente si seguono dei procedimenti combinati.

Il metodo comunemente usato in questo Istituto per es. è il seguente: Innesto del materiale sospetto in brodi fenico-cloridrici del Parietti escludendo quelli della prima serie che per la debole acidità permettono lo sviluppo di altri germi.

2° dopo ventiquattro ore di permanenza dei tubi nel termostato a 37-41° scelta di quello più uniformemente intorbidato e passaggio dal medesimo di un'ansa del materiale in gelatina al brodo di Loeffler lattosato e contemporaneamente in gelatina Piorkowski. Se si produce gas lungo l'infissione in gelatina lattosata e contemporaneamente nella gelatina Piorkowski non si sviluppa alcuna colonia a filamento, si esclude la presenza del b. del tifo. Se invece in tale terreno si hanno di queste colonie allora si innestano per infissione in altra gelatina al lattosio. Se vi si producono bolle di gas si esclude la presenza del tifo, in caso contrario si passa all'innesto in brodo, poi alla siero-reazione di Widal. E siccome anche quando con tal procedimento la siero-reazione è negativa non è lecito escluderne l'identità col b. di Eberth del germe isolato se non dopo aver tentato di renderlo patogeno ed agglutinabile, così dato questo caso si sottomette il germe ai seguenti procedimenti:

1° Innesto in agar contenente i prodotti solubili ed insolubili del b. di Eberth in anaerobiosi;

2° Passaggio ripetuto in animali;

3° Coltura in brodo in anaerobiosi.

Io riprendendo le osservazioni già fatte mi sono prefisso di vedere se fosse possibile anche per mezzo di altri procedimenti giungere a

trovare il b. di Eberth in un materiale contenente non solo il *coli* e *coli* simili, ma anche quei germi causa della dissenteria studiati dal Celli e dal Shiga. A tal uopo ho seguito il seguente procedimento distinto in tre tempi:

1° Separazione del *coli* e del tifo dagli altri germi;

2° Separazione del tifo dal *coli*;

3° Separazione del tifo dai tifosimili.

Procedimento I. — Servendomi del metodo Parietti abolii l'innesto nel brodo meno acido e studiai negli altri tenuti a 41° la rapidità di sviluppo dei tifo e tifosimili, *coli* e colisimili che avevo a disposizione. A questa temperatura dopo 36 ore notai intorbidamento dei diversi brodi nei quali avevo innestato due tifi, il *coli* comm., il b. disenterico, 1 colisimile, 2 tifosimili. Mescolando insieme i vari germi e innestandoli nei medesimi terreni trovai così che l'isolamento del b. di Eberth nei mezzi suaccennati può riuscire ma è però molto difficoltoso. Per tali ragioni il metodo Parietti da solo appariva insufficiente alla separazione del tifo.

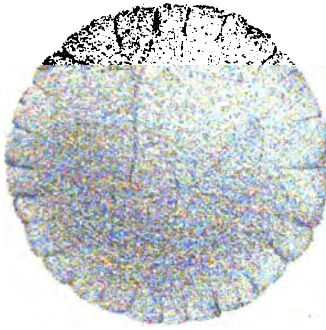
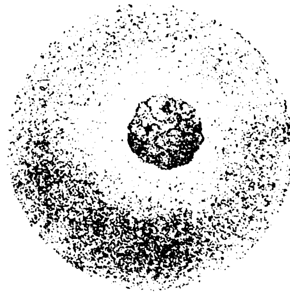
Mescolando però altri germi al b. di Eberth, tale metodo apparve di maggiore sensibilità, infatti dei germi banali delle acque e molti delle feci uniti seminati nei brodi Parietti, nessuno si sviluppò dopo tre giorni a 41°; ebbi invece costantemente lo sviluppo di un germe che conobbi agglutinabile dal siero di tifosi. Riporto l'elenco dei germi seminati:

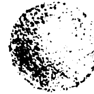
B. nubilum, *aerobicum*, *ceruleum, acidi lactici*, *subtilis*, *megaterium*, *radiosus, mesentericus*, *morbificans*, *liquidus*, *viscosus*, *fluorescens non liq.*, *vulgare*, *zopfi*.

Procedimento II. — Per rendere maggiormente sensibile il metodo di isolamento del bacillo di Eberth, pensai di innestare il materiale culturale in substrati i quali fossero di recente considerati, se non specifici quasi del b. di Eberth ed a tutti prescelsi il liquido di Cambier che secondo l'autore non permette lo sviluppo del coli; lo gelatinizzai per rendere separabili le colonie nella proparzione del 10 per cento ed in quella più diluita del 3 30 °/₀.

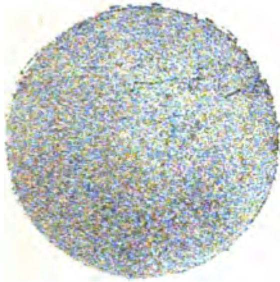
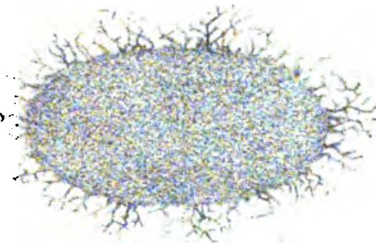
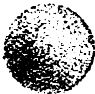
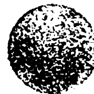
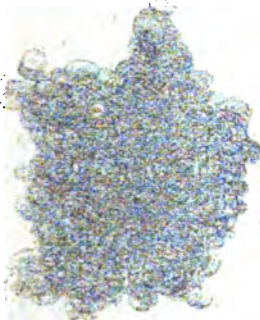
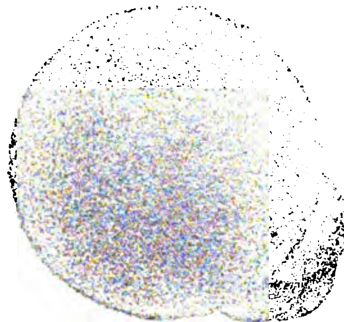
Notai anzitutto lo sviluppo di colonie piccole puntiformi nello spessore del substrato con gli stessi caratteri nella gelatina al 3-10 °/₀. Esaminate al microscopio ebbi a notare delle differenze nel loro aspetto tali da poterle distinguere nei seguenti sei tipi:

1° *tipo*. — Colonie puntiformi biancastre al microscopio finemente granulose margini reg. bianco-giallastre le più piccole, le più grandi nucleate con nucleo ben limitato, bitorzoluto e con gemme. Il resto della colonia intorno al nucleo è difficilmente distinguibile in due



Tipo I



Tipo II

strati di cui l'esterno è più fortemente granuloso. Le più grandi visibili ad occhio nudo quasi come capocchie di spillo fortemente granulose, sferiche, giallastre a bordi distintamente globati, nessun nucleo è visibile nelle medesime. A questo tipo appartengono un colisimile un similtifo.

2° *tipo.* — Colonie puntiformi appena visibili, separate, rotonde, al microscopio contenuto finemente granuloso a bordi irregolari sfrangiati. Fra di esse si nota qualche colonia sferica profonda simile al tipo n. 1, Tifo *b,* colonie puntiformi piccole, separate e granulose di color giallo-bruno ma di una tonalità meno intensa delle precedenti. Le più piccole perfettamente sferiche col centro maggiormente granuloso. Alcune colonie presentano un bordo protuberante che rassomiglia ad una gemma; altre presentano i bordi più o meno festonati ricordando così il tipo di alcune colonie del colisimile n. 6.

A questo tipo appartengono 2 tifi (Eberth), un similtifo, il coli disenterico, il coli Shiga.

3° *tipo.* — Colonie piccole puntiformi rotonde fortemente granulose senza alcun carattere speciale con tendenza a forma ovale invece che rotonda.

A questo tipo appartengono un colisimile, un similtifo.

4° *tipo.* — Colonie rotonde piccolissime, tipo streptococicco poco granulose giallognole, molte sembrano risultare dalla sovrapposizione totale o parziale di colonie della identica grandezza.

A questo tipo appartengono 2 colisimili, il coli comune, un similtifo.

5° *tipo.* — Colonie puntiformi a bordi leggermente festonati. Colonie grandi costituite da un nucleo granuloso a bordi indefiniti dai quali si spargono serie di finissimi puntini che si perdono nella gelatina.

A questo tipo appartengono un similtifo ed un coli.

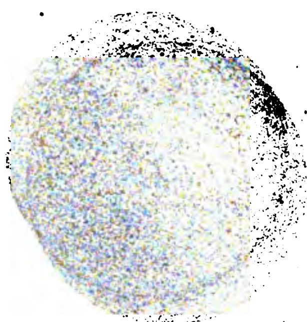
6° *tipo.* — Colonie profonde costituite da un grande nucleo bruno ben delimitato circondato da un alone più chiaro, poi da un altro più granuloso ma sempre meno del nucleo.

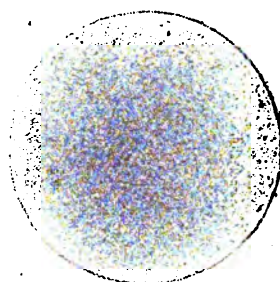
Colonie superficiali, trasparenti, rotonde, appena visibili, con granulosità sparse irregolarmente nella massa centrale. Ad occhio nudo tali colonie biancastre profonde a cupola quasi come una capocchia di spillo; non fondenti.

A questo tipo appartengono un bacterio viscoso che si isola dal-

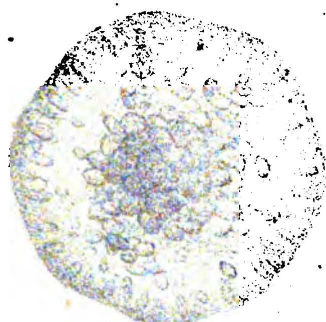


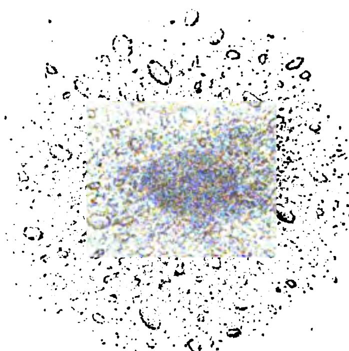
Tipo III.



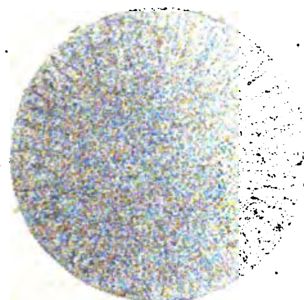


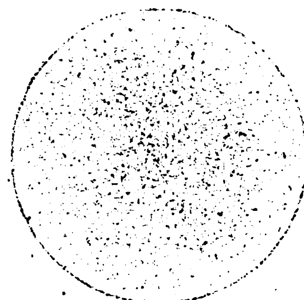
Tipo IV.





Tipo V.





Tipo VI.

l'acqua col metodo Abba e che dapprima sembra un coli ma poi si può identificare col *b. viscosum*.

Come si vede dalla presente tabella ambedue i tifi, un similtifo ed i coli disenterici studiati formarono una colonia dello stesso tipo. Adunque neppur con tale procedimento mi sembrò possibile ottenere netta separazione tra tifo e coli, però il metodo indubbiamente era più sensibile di quello di Parietti perchè mi permetteva di eliminare il più grande numero di germi vicinissimi al tifo.

Cercai allora di vedere se la distinzione potesse farsi mediante il procedimento del Drigalski. Perciò preparai il terreno di nutrizione (1) da lui consigliato e vi seminai per strie dapprima, poi per diluizione i germi isolati in gelatina Cambier rappresentanti quelli del secondo tipo. Ottenni seminando il *b. di Eberth, i b. dissenterici di Celli e Shiga* che il substrato assumeva un tinta bluastra che si comunicava anche alle colonie e per il *coli* una tinta rosso-mattone che solo molto tardi tende a passare al bleu. Evidentemente col metodo Drigalski si ottengono gli stessi risultati che si hanno con la gelatina al brodo di Cambier.

A voler quindi accertarsi dell'esistenza del tifo con altre indagini non rimaneva che servirsi del processo siero-diagnostico e questo è in realtà quello che permette di fare la diagnosi definitiva purchè però i bacteri provengano di recente dall'animale.

Conclusione.

1° Per la ricerca del b. di Eberth è necessario tener presente che attorno ad esso esiste un vasto gruppo di forme ascritte alla varietà dei simil tifi ben difficili da distinguere fra di loro pei caratteri morfologici. I caratteri biologici aggiunti non possono che separare coli e molti colisimili dai tifi e da molti tifosimili non già i tifi dai tifosimili più ad essi vicini.

2° I metodi per la ricerca dell'Eberth presi separatamente non sono commendabili o perchè non lo separano dai coli e dai tifosimili o perchè escludono dal gruppo di Eberth quei similtifi che indubbiamente sono dei tifi attenuati: in ogni caso servono ugualmente per l'isolamento dei bacilli della dissenteria (Celli, Shiga).

(1) Brodo di carne peptonizzato con nutrosio e agar 3 %, Lattosio 1.5 %, Soluzione di laccamuffa 13 %, Violetto cristallizzato 0.01 %.

3° Il procedimento unico per ottenere una differenziazione non è ancora trovato, però accoppiandone alcuni dei già noti è possibile giungere all'uopo; cosichè un procedimento che dà buone risultanze è il seguente:

1° Innesto nei brodi Parietti più acidi.

2° Isolamento dei germi in gelatina al brodo Cambier.

3° Semina del materiale tratto dalle colonie caratteristiche in agar al violetto cristallizzato di Drigalski.

4° Siero-diagnosi sul germe precedentemente inoculato in cavie e ripreso delle medesime.

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

La siero-immunità dei liquidi organici (urina, bile)

Ricerche del dott. **ROBERTO BINAGHI,**
libero docente di patologia chirurgica.

Era noto, già da tempo, che in certi animali allo stato normale esistono delle sostanze, che diventano tossiche per certe cellule di animali d'altra specie.

Non è però che in questi ultimi anni che si è dimostrata sperimentalmente la possibilità di provocare nell'organismo la comparsa di questi veleni d'origine animale — che Metchnikoff ha proposto di chiamare *citotossine* — mediante l'introduzione di certi elementi cellulari.

Così sui primi fatti fondamentali, stabiliti da Belfanti e Carbone, Bordet, Ehrlich e Morgenroth, Dünger ed altri, veniva inalzato tutto il grande edificio moderno dei *sieri citotossici*.

Non era infatti difficile, dopo quelle prime scoperte, concepire il disegno di preparare delle citotossine specifiche per ogni specie di elemento figurato, nutrendo allo stesso tempo la speranza di potere un giorno utilizzare tali veleni artificiali. per regolarizzare le funzioni cellulari anormali.

L'attività scientifica degli osservatori, rivolta a questo nuovo campo della patologia, non fu scarsa di risultati.

Il Landsteiner nel 1899 annuncia la scoperta della *spermotossina* nel siero dei conigli, trattati con iniezioni di spermatozoidi di toro. Düngern nello stesso anno pubblica la descrizione della *tricotossina*, che immobilizza le ciglia vibratili dell'epitelio tracheale del bue. Metchnikoff e Besredka nel 1900 trovano la *leucotossina*; Lindemann e Nefedieff la *nefrotossina;* Delezenne la *neurotossina:* lo stesso Delezenne e Deutsche l'*epatotossina;*

Centanni un *siero cardiotossico*, che paralizza il cuore della rana. Nel giugno del 1901 Ceconi pubblica le sue ricerche sull'*ovariotossina*, che immobilizza rapidamente le ciglia vibratili dell'epitelio tubarico della cavia. Nello stesso anno Surmont trova un *siero tossico per il pancreas;* Bigart e Bernard un siero *surrenotossico;* e finalmente il Sulli un siero *mielotossico*, che altera profondamente la struttura intima degli eritroblasti e dei megacariociti del midollo osseo dei conigli; e il Goutscharukov un siero tossico per la tiroide del cane, il quale presenta una fenomenologia gravissima, analoga a quella che si verifica dopo l'estirpazione della glandola.

***

Se è stato possibile adunque produrre dei sieri tossici coll'inoculazione degli elementi cellulari di organi, non lo sarà del pari, mediante l'introduzione dei liquidi elaborati da questi stessi organi?

Per le due più grandi glandole dell'organismo ad esempio, il rene e il fegato, non sarà possibile produrre dei sieri tossici colla inoculazione di urina e di bile?

E passando nel campo della terapia — per quanto la fase terapeutica, per così dire, delle citotossine non sia ancora aperta, trovandoci noi a questo riguardo in un periodo paragonabile a quello, in cui le ricerche fatte sulle tossine microbiche stavano per preludiare la scoperta della sieroterapia — passando, ripeto, nel campo della terapia, non sarà possibile riuscire a conferire agli animali un'immunità artificiale, provocando in essi la produzione di antitossine, mediante l'inoculazione di siero d'altro animale contenente le tossine specifiche?

Questa immunità artificiale non è forse l'espressione, direi quasi esteriorizzata e artificialmente rafforzata, dell'immunità naturale?

E come l'organismo reagisce di fronte alle tossine microbiche, elaborando delle antitossine specifiche, non reagirà ugualmente di fronte alle tossine cellulari?

Che cos'è infine questa funzione antitossica generale dell'organismo, se non un modo di reazione speciale dello stesso organismo, sviluppato a contatto delle tossine?

Da queste considerazioni generali è scaturita l'idea del presente lavoro, che ha il seguente scopo: *se è possibile preservare i conigli dall'azione tossica mortale dell'urina e della bile, mediante iniezioni di siero di cane, preparato con la stessa urina e con la stessa bile.*

***

Tossicità dell'urina umana. — Credo inutile riandare tutta la ricca letteratura esistente sull'argomento. Tralasciando quindi di ricordare tutti gli autori, che si sono occupati dei molteplici lati dell'importante questione, dal punto di vista di condizioni del tutto speciali, accennerò soltanto e brevemente a quei lavori, che, trattando della tossicità urinaria in genere, hanno attinenza colle mie ricerche.

Le celebri esperienze del Bouchard (1) avevano stabilito che la media della quantità di urina di un adulto sano, capace di uccidere un chilogrammo d'animale, per inoculazione endovenosa, si poteva calcolare in 45 cmc.

Nel 1891 Mairet e Bosc (2), in seguito a una serie di ricerche sull'urina, tanto normale che patologica, modificarono notevolmente la cifra del Bouchard, portandola a 67 cmc. e accettando quella del Bouchard soltanto come quantità tossica mediata *éloigné*.

Il Picchini e il Conti (3) confermarono la media dei due autori francesi, pur osservando che è tutt'altro che facile stabilire in modo preciso il coefficiente urotossico normale, tanto in via generale come nei casi speciali, basandosi sopratutto sul fatto — già dimostrato da altri — del diverso modo di reagire dei vari conigli anche verso sostanze tossiche più dosabili, come il solfato di stricnina.

Fubini e Modinos (4) invece, in un lavoro diretto a dimostrare la possibilità di salvare i conigli dall'avvelenamento di urina normale con l'inoculazione successiva immediata di soluzione fisiologica, stabilirono dei limiti abbastanza grandi, variando il grado della tossicità urinaria, nei diversi esperimenti fatti, da un minimo di 24.51 a un massimo di 51.92 cc.

Nel 1899 il Cassata (5), studiando la tossicità urinaria in rapporto all'alimentazione, non accetta nessuna delle cifre stabilite dai vari autori. La tossicità, secondo l'A., è tutta relativa: mentre occorrono soltanto da 40 a 50 cc. di urina di individui sottoposti a dieta esclusivamente carnea, per uccidere un chgr. di coniglio, ne occorrono invece più di 100, quando si tratta di urine di individui sottoposti da diverso tempo a dieta lattea.

Nello stesso anno il Santangelo (6) riuscì a dimostrare che per l'adulto sano l'*urotossia*, vale a dire la quantità di urina fisiologica necessaria a

(1) *Recherches expérimentales sur la toxicité des urines normales* (1884), e *Leçons sur les auto-intoxications dans les maladies* (1887).

(2) *Recherches sur la toxicité de l'urine normale et pathologique* (1891).

(3) *La tossicità delle urine in alcuni casi di anemia*, 1893.

(4) *Iniezione endovenosa di soluto acquoso di cloruro di sodio nell'avvelenamento prodotto dall'orina di persona sana*, 1895.

(5) *Ricerche sperimentali sulla tossicità delle urine umane in rapporto all'alimentazione.* Il Policlinico, 1899.

(6) *Della tossicità urinaria nei bambini, in rapporto a quella degli adulti.* Il Policlinico, 1899.

uccidere un chigr. di materia viva, oscilla in media fra i 70 e gli 80 cc., e che essa è in ragione inversa della quantità totale di urina emessa nelle 24 ore. e in ragione diretta del suo peso specifico, dell'intensità di colore e della percentuale d'urea.

Come spiegare la diversità dei risultati ottenuti? Le cifre trovate dai vari esperimentatori rappresentano il vero grado di tossicità urinaria? I disturbi d'ordine meccanico, derivanti dalla penetrazione in circolo di notevoli quantità di liquido, e quelli di natura fisico-chimica dipendenti dal diverso grado di concentrazione molecolare tra liquido iniettato e siero di sangue degli animali, non possono influire sul valore assoluto di tale tossicità?

Erano questi i nuovi quesiti, che sorgevano nella mente degli osservatori dinanzi a tanta disparità di risultati; quesiti, i quali sembrava dovessero sostanzialmente modificare il valore delle ricerche.

Già il Posner (1), praticando delle iniezioni sottocutanee di soluzioni di cloruro di sodio nei topi bianchi, aveva notato delle differenze rilevanti nei risultati, a seconda del grado di concentrazione del liquido.

Preoccupato del fatto, istituì delle ricerche e riuscì a dimostrare che, mentre l'inoculazione di una soluzione fisiologica al 0 .91 °/₀, soluzione press'a poco isotonica al siero di sangue del topo, non produceva nessuna azione tossica, anche inoculata in quantità eguale al peso del corpo; le soluzioni invece di maggiore o minore concentrazione erano tossiche, proporzionalmente circa alla differenza.

In base a tali risultati, l'A. applicò lo stesso principio all'urina, e trovò anche per questa un'azione tossica corrispondente al grado di concentrazione.

Sì che per poter trarre dalla tossicità dell'urina delle conclusioni esatte, bisognava diluirla fino a renderla isotonica col siero di sangue; pur facendo notare che i metodi non erano ancora sufficientemente esatti per esprimere in cifre la differenza fra azione tossica da ipertonia e tossicità specifica.

L'argomento evidentemente aveva bisogno di ulteriori studi; e di fatti, dopo quello del Posner, comparvero molti altri lavori, ad alcuni dei quali è bene accennare.

Il Quinton (2) riferì i risultati di una serie di iniezioni comparative di urine patologiche, riportate a un punto vicino all'isotonia, praticate nei cani.

Per evitare anzi tutto i disturbi d'ordine meccanico, egli iniettava il liquido molto lentamente (0. 75 cc. per kg. d'animale e per minuto), e non continuava l'iniezione fino a provocare la morte, per lasciare alle tossine il tempo d'agire.

Dopo avere descritto i fenomeni generali osservati negli animali, tanto più precoci quanto maggiore era la tossicità dell'urina, e dopo avere stabilito, in via generale, che l'abbassamento termico è funzione della tossicità dell'urina impiegata, e che l'eliminazione renale da parte degli animali inoculati è inversamente proporzionale alla tossicità, l'A. viene ad una conclusione assai importante e ben diversa da quella di Posner e di altri esperimentatori: che l'aggiunta di acqua distillata all'urina, per riportarla al punto

(1) *Società medica di Berlino,* dicembre 1899.
(2) *Iniections comparatives d'urines toxiques.* Société de biologie, juin 1900.

di congelazione del siero, è un procedimento difettoso e non scevro di critiche severe.

Di fatti, essendo l'urea l'elemento principale dell'urina e sapendosi che la presenza d'urea in una soluzione ne eleva notevolmente il punto di congelazione (una soluzione d'urea al 10 ‰ si congela a — 0° 28), ne segue che un'urina riportata al punto di congelazione del siero, è più o meno fortemente ipotonica per il globulo rosso.

La sua iniezione pertanto non è esente da quei disturbi dell'osmosi, che si credeva appunto evitare colla diluizione. Anzi questi disturbi possono essere anche aggravati, come dimostrano appunto i risultati ottenuti da Lesné, Bernard, Hallion e Carrion, i quali hanno osservato per l'urina isotonica una tossicità spesso maggiore di quella dell'urina non diluita.

Per il Quinton quindi l'urina lorda, astrazione fatta dell'urea che contiene, è ordinariamente più vicina all'isotonia ematica, di quello che sia dopo che le si è dato un punto di congelazione analogo a quello del siero di sangue.

Quasi contemporaneamente al Quinton, Claude e Balthazard (1), i quali in ricerche anteriori avevano stabilito la necessità assoluta di far subire una correzione ai risultati ottenuti nello studio della tossicità urinaria, a causa della mancanza d'isotonia fra l'urina e il sangue di coniglio, scelto come animale reattivo, in successive esperienze studiarono di nuovo l'argomento prendendo in esame diverse diluizioni di una stessa urina, di cui scelsero quella a tossicità massima, ma nella quale allo stesso tempo fosse soppressa l'azione nociva d'ordine fisico. E trovarono una diluizione *optima*, il cui punto di congelazione era — 0° 56, valore molto vicino al punto di congelazione del siero di coniglio.

Ma videro che erano costretti a iniettare nelle vene delle quantità considerevoli di liquido, il che esponeva a nuovi errori di esperimento.

Per evitare tali inconvenienti, cercarono allora di determinare la tossicità dell'urina non diluita, facendone la correzione col mezzo di una tavola, basata sui risultati delle loro esperienze: tavola, che, secondo essi, dà una approssimazione sufficiente, e secondo la quale, nella maggioranza dei casi, l'errore nel calcolo della correzione d'isotonia risulterebbe inferiore a 1/10 della tossicità vera, il che, in una ricerca di questo genere, può essere considerato come soddisfacente.

Così le difficoltà, che sembravano da principio insormontabili, per risolvere la questione dell'osmonocività dei liquidi tossici, come l'urina, andavano man mano perdendo della loro importanza.

Il Bosc e il Vedel (2) infatti, allo scopo di conoscere l'azione di ciascuno dei fattori di tossicità, hanno studiato da prima delle soluzioni saline semplici, poi dei miscugli di due o più sali, in modo da ottenere delle soluzioni che si avvicinassero ai liquidi naturali, come l'acqua di mare, e infine delle soluzioni più complesse e costituenti, per le proprietà delle sostanze disciolte, quasi un'urina artificiale.

Le loro esperienze hanno dimostrato che non è necessario riportare un

---

(1) *Toxicité urinaire et isotonie.* Société de biologie, juin 1900.

(2) *De la valeur de l'osmonocivité dans la recherche de la toxicité des liquides* XIII. Congrès Internat. de Méd., 1900.

liquido all'isotonia, per misurare la sua tossicità. Questa è tanto più vera per quanto si tratta di soluzioni poco tossiche o di liquidi complessi, i cui componenti possono presentare proprietà molto dissimili.

Concludono affermando che la ricerca della tossicità urinaria, per iniezione intravenosa, deve essere praticata con l'urina in natura.

Le incertezze e le difficoltà tecniche da una parte, le rigorose obbiezioni teoriche dall'altra, hanno riportato adunque la questione al punto di prima; sì che devesi ritenere, pur accettando la correzione di $^{1}/_{10}$ proposta dal Claude e Balthazard, che per stabilire il grado di tossicità di un'urina, la si deve inoculare allo stato naturale.

***

Per quanto riguarda la *natura delle sostanze da cui dipende la tossicità dell'urina*, secondo alcuni autori essa è dovuta esclusivamente ai sali di potassio, ritenendo l'urea affatto innocua, altri l'ascrivono ai sali di potassio insieme all'urea, altri infine alle materie coloranti.

Il Bonardi anzi specificò ancora meglio l'azione tossica di ciascun componente, affermando che all'urea sono da attribuirsi specialmente le convulsioni e i movimenti pro-retro e latero-pulsivi; al potassio invece la depressione generale e la paralisi bulbare, e infine all'azione cumulativa delle due sostanze, nonchè delle altre meno importanti, il resto dei fenomeni tossici.

Coloro che ammettono che il veleno più importante dell'urina sia il potassio, che chiamano sostanza *convulsionante*, si basano sul fatto sperimentale che, neutralizzando il potassio con acido tartarico, l'urina perde il 50 per cento circa della sua tossicità.

Coloro poi che fanno dipendere la tossicità urinaria esclusivamente o quasi dalle materie coloranti, sarebbero riusciti a isolare quattro sostanze, tutte di natura organica: una narcotica, una convulsionante, una miotica e una ipotermizzante, le quali, iniettate negli animali, avrebbero dato luogo a fenomeni tossici, simili a quelli prodotti dall'urina totale.

Tale ipotesi però sarebbe in parte contradetta dal Bouchard, il quale avrebbe trovato che, scolorando l'urina col carbone animale, la sua tossicità sarebbe ridotta soltanto di un terzo.

Come si vede, si tratta di conoscenze molto imperfette e assai discordanti fra loro.

Per l'urea poi la discordanza è ancora maggiore fra i diversi sperimentatori. Ad ogni modo, non si può ad essa negare un'azione

tossica. Iniettata in vena, provoca nei conigli fenomeni tossici gravi, identici a quelli che si ottengono coll'urina, e il quadro sintomatologico si svolge sino alla fine con gli stessi caratteri.

Soltanto si richiedono delle quantità certamente notevoli. Già il Bouchard aveva osservato che mentre le dosi piccole e medie non provocano che la diuresi, le dosi alte determinano fenomeni tossici evidenti. Lo stesso Santangelo nel lavoro già citato conclude che realmente la tossicità di un'urina cresce col crescere della sua percentuale d'urea, e viceversa; e pure ammettendo che essa non rappresenti nè l'unico, nè il più potente dei veleni eliminati dal rene, non si può disconoscere che essa è indubbiamente una sostanza velenosa di grado non trascurabile.

Era necessario stabilire questi dati fondamentali, prima di esporre le mie ricerche sull'urina umana e sulle soluzioni artificiali d'urea — per determinarne la dose minima mortale per kg. di coniglio — volendo naturalmente fornire dei risultati, che non potessero essere attaccabili dal punto di vista della tecnica, e premunendomi così da possibili errori, che valessero a modificarne il valore.

Tecnica degli esperimenti. - Si raccoglievano in recipienti sterilizzati le urine, emesse nelle 24 ore, di un individuo adulto sano, sottoposto a dieta mista. Un litro di queste urine, filtrato allo Chamberland, venne diviso in 50 provette sterilizzate, ciascuna delle quali conteneva così 20 cc.

Con questa urina *tipo* fisiologica ho iniziato le mie ricerche.

Dopo un certo numero di esperienze però ho potuto constatare che si richiedeva una quantità troppa elevata di urina, per provocare la morte di un kgr. di coniglio (100 cc. e più); sì che, per avere un'urina più tossica, ho continuato le esperienze con urine patologiche.

Queste furono raccolte da una giovane di 16 anni, ricoverata in quest'Ospedale Civile per *nefrite cronica parenchimatosa.*

I caratteri dell'urina erano i seguenti: torbida, di reazione acida, del P. S. di 1026; quantità media delle 24 ore cc. 900; albumina gr. 20 $^0/_{00}$; urea 3. 46 $^0/_0$. All'esame microscopico molti cristalli d'acido urico e cilindri granulosi di varia grandezza. Pochi globuli rossi e molti leucociti.

Anche queste urine venivano filtrate allo Chamberland e raccolte in tubi sterilizzati.

Per praticare le iniezioni nei conigli, ho adoperato il solito apparecchio molto semplice, costituito da una buretta graduata della capacità di cc. 50, fissata ad un'asta verticale. La buretta era munita, al suo estremo inferiore, di un tubo di gomma, lungo cm. 50 e terminante in un ago di Pravaz. Il tutto veniva prima accuratamente sterilizzato. Una piccola pinza, posta immediatamente al di sopra del punto d'attacco dell'ago, serviva ad aprire o interrompere la corrente del liquido.

Delle vene ho scelto una delle femorali, che in conigli del peso medio

di 1 kg. presentano un calibro sufficiente per l'introduzione di un ago di media grandezza.

L'iniezione si continuava ininterrottamente sino alla morte dell'animale, per poter così stabilire la *tossicità sperimentale immediata.*

L'urotossia veniva ricavata con la nota formula

$$\frac{1000 \times q}{p}$$

dove q rappresenta la quantità di urina inoculata e p il peso dell'animale.

Le iniezioni sottocutanee nei cani si praticavano invece con una comune siringa, della capacità di cc. 50.

Queste iniezioni furono graduali e progressive: da un minimo iniziale di cmc. 10 a un massimo finale di cmc. 50-60, continuate, quasi sempre a giorni alterni, per un periodo di tempo variabile dai 30 ai 40 giorni; sì che la quantità totale iniettata variava da cmc. 500 a 600, proporzionale al peso degli animali.

Dall'ultima iniezione al momento di salassare il cane, non trascorsero meno di otto giorni.

Effetti urotossici nei cani. — Dopo le prime iniezioni di dosi piccole (cmc. 10-15), gli animali non presentano nulla di particolare. L'urina, iniettata nel cellulare sottocutaneo (regione inguinale, regione interna della coscia, regione laterale dell'addome), si riassorbe abbastanza rapidamente. In media, dopo 20-30 minuti, non v'ha più traccia di liquido. Quando la quantità inoculata è notevole (cmc. 40-50), un leggiero massaggio praticato sulla regione ne favorisce il riassorbimento.

Dopo la 5ª o 6ª iniezione cominciano in generale a verificarsi i primi disturbi, i quali vanno man mano accentuandosi e complicandosi ad altri, che è interessante notare, e di cui presento una specie di schema, corrispondente nel suo insieme ai caratteri più salienti osservati nei tre cani inoculati.

Immediatamente dopo, talvolta anche durante l'iniezione, l'animale emette dei gemiti, e con movimenti bruschi degli arti posteriori tenta liberarsi dall'apparecchio di contenzione.

Evidententemente il dolore provocato dalla distensione subìta dalla cute, per la presenza del liquido, spiega tale fenomeno doloroso, il quale però cessa subito.

Liberato l'animale, entrano in scena altri fenomeni assai più interessanti. Gli arti posteriori si flettono, l'andatura diventa difficile e quasi atassica, si ha emissione di urina e di feci e talvolta salivazione. L'animale, impossibilitato a reggersi oltre, per una specie di paresi che colpisce il treno posteriore, va tentennante a giacere su di un lato, eseguendo movimenti scomposti e disordi-

nati, che hanno per effetto di modificare di tanto in tanto la sua posizione. Anche dopo diverse ore, rifiuta il cibo, beve soltanto poca acqua e a piccoli sorsi, mostrando una certa difficoltà nella deglutizione.

All'indomani i fenomeni sono completamente scomparsi: l'animale mangia, cammina bene e ritorna vivace come prima.

Col ripetersi però di tali crisi, gli animali vanno sempre più indebolendosi: il dimagramento si fa progressivo, tanto che alla fine delle iniezioni presentano un aspetto cachettico, a riparare il quale non giova neppure un'alimentazione abbondante.

Evidentemente l'avvelenamento cronico, cui vanno in preda, altera profondamente i processi del ricambio materiale.

Alla fine delle esperienze, i cani furono sacrificati e i loro reni sottoposti ad esame microscopico. Le alterazioni istologiche, assai interessanti, riscontrate in questi organi, saranno minutamente descritte in seguito.

Effetti urotossici nei conigli. — Tutti i conigli, nei quali l'iniezione è stata continuata fino a provocare la morte, hanno presentato in generale lo stesso quadro d'intossicamento. Le particolarità, riscontrate in ogni singolo animale, sono registrate nel quadro che segue.

Il primo fenomeno che si manifesta è la miosi, più o meno accentuata, secondo i vari animali.

Compaiono poscia i disturbi da parte del respiro, il quale diventa sempre più frequente sino ad aversi una dispnea gravissima (100 respiri e più al minuto). Qualche volta si ha un respiro a tipo Cheyne-Stokes.

Contemporaneamente diventano frequenti i battiti cardiaci, i quali, vigorosi in principio, vanno man mano indebolendosi fino a cessare del tutto. Quasi sempre, anche dopo la cessazione del respiro, il cuore continua a pulsare, ma assai debolmente e con molta irregolarità.

D'ordinario verso la metà dell'iniezione, si manifestano le prime convulsioni tonico-cloniche, talvolta precedute da un tremore generale, le quali si ripetono a intervalli sempre più brevi, finchè la morte avviene in un classico opistotono.

Talvolta in principio, tal'altra alla fine dell'esperienza, gli animali emettono urine e feci.

La morte è preannunziata da esoftalmo notevole e da un abbassamento di temperatura, che varia da 2 a 3 gradi.

Non tutti i conigli hanno presentato questa successione di feno-

meni. Alcuni abbattuti e istupiditi sin dal principio, rimanevano in questo stato per tutto il tempo dell'esperienza, fino a che, colti fulmineamente da forti movimenti antero- e retro-pulsivi, morivano improvvisamente, senza presentare fenomeni speciali preannunzianti la morte.

In questi casi non vi era emissione di urina. All'autopsia però si trovava la vescica enormemente distesa, quasi in stato paralitico. E mentre in molti degli altri conigli, come già dissi, i battiti cardiaci continuavano, sebbene deboli e irregolari, anche dopo la cessazione dei movimenti respiratori, in questi casi si aveva contemporaneo arresto del respiro e del cuore.

All'autopsia, praticata immediatamente dopo la morte, tutti gli animali hanno presentato le stesse alterazioni: cuore in diastole, con le cavità ripiene di sangue; congestione passiva in tutti gli organi.

Esperienza I. — Coniglio del peso di kgr. 1.000.
Urina inoculata cmc. 78.
Urotossia 78.

Effetti urotossici. — Dopo cmc. 30 miosi e prime scosse; dopo cmc. 50 contrazioni tonico-cloniche; dopo 70 emissione di urine e feci. A 78 convulsioni fortissime e morte in opistotono.

Esperienza II. — Coniglio del peso di kgr. 1.250.
Urina inoculata cmc. 100.
Urotossia 80.

Effetti urotossici. — Miosi e tremore generale dopo 40 cmc. A 60 prime scosse ed emissione di urina, dispnea intensa. A 100 esoftalmo e morte in opistotono, con temperatura rettale di 36°. 5.

Esperienza III. — Coniglio del peso di kgr. 1.150.
Urina inoculata cmc. 95.
Urotossia 81.73.

Effetti urotossici. — Dopo cmc. 40 prime scosse: dopo 70 emissione di urine e altre scosse; dopo 80 dispnea, battiti cardiaci frequentissimi: a 95 morte fra contrazioni tonico-cloniche generali, con esoftalmo notevole ed emissione di feci poltacee.

Esperienza IV. — Coniglio del peso di kgr. 1.020.
Urina inoculata cmc. 76.
Urotossia 74.50.

Effetti urotossici. — Animale abbattuto e istupidito sin dal principio. A 76 cmc. morte improvvisa con forti contrazioni antero- e retropulsive.

Esperienza V. — Coniglio del peso di kgr. 1.230.
Urina inoculata cmc. 93.
Urotossia 75.61.

Effetti urotossici. — Dopo cmc. 30 leggera miosi. A 50 respiro frequente; a 70 prime scosse, che si ripetono a brevi intervalli fino alla morte, che avviene con esoftalmo notevole e in una scarica contemporanea di urine e feci.

Esperienza VI. — Coniglio del peso di kgr. 0.950.
Urina inoculata cmc. 70.
Urotossia 73.68.

Effetti urotossici. — Dopo cmc. 40 prime scosse; dopo 60 tremore generale, respiro di Cheyne-Stokes, esoftalmo; dopo altri 10 cmc. morte in opistotono.

Esperienza VII. — Coniglio del peso di kgr. 1.250.
Urina inoculata cmc. 97.
Urotossia 77.52.

Effetti urotossici. — L'animale tollera bene l'iniezione fino a 80 cmc., senza presentare fenomeni speciali. A 85 cominciano le convulsioni, accompagnate da forte dispnea. A 95 si ripetono le convulsioni, esoftalmo e morte a 97 in opistotono.

Esperienza VIII. — Coniglio del peso di kgr. 0.980.
Urina inoculata cmc. 80.
Urotossia 81.63.

Effetti urotossici. — Dopo 50 cmc. miosi e prime scosse; dopo 66 altre scosse ed emissione di urina. A 75 esoftalmo e nuova emissione di urine; morte a 80 in un accesso violento di convulsioni generalizzate.

Esperienza IX. — Coniglio del peso di kgr. 1.040.
Urina inoculata cmc. 84.
Urotossia 80.76.

Effetti urotossici. — Dopo 30 cmc. miosi e respiro frequente. A 45 fenomeno di Cheyne-Stokes. A 70 prime scosse. Morte a 84 con notevole esoftalmo in classico opistotono. Nessuna emissione di urina (alla autopsia vescica enormemente distesa).

Esperienza X. — Coniglio del peso di kgr. 0.920.
Urina inoculata cmc. 71.
Urotossia 78.25.

Effetti urotossici. — L'animale non si risente affatto dell'inoculazione. D'un tratto, a 71 cmc., scoppio improvviso di convulsioni tonico-cloniche e di movimenti antero- e retro-pulsivi. Morte.

NB. Media delle urotossie 78.16.

Come risulta da questo quadro, la media delle quantità di urina inoculata nei dieci animali, fra un minimo di cc. 70 e un massimo di cc. 100 (Vedi Esperienze VI e II) è di circa cc. 85; e corrispondentemente la media delle urotossie, fra la minima di 73. 68 e la massima di 81. 73 (Vedi Esperienze VI e III) è di 78. 16.

Volendo naturalmente stabilire una cifra, che non potesse darmi risultati dubbii, ho fissato in 80 cc. la quantità di urina necessaria a a uccidere 1 kgr. d'animale, colla quale appunto ho praticato le ricerche sull'immunità.

***

Immediatamente dopo queste esperienze, ho iniziato quelle con l'urea, allo scopo di stabilire, anche per questa sostanza, la dose minima mortale per kgr. di coniglio.

Le prime iniezioni endovenose furono fatte con soluzioni sterilizzate, di cui 1 cc. conteneva gr. 0,25 di urea, e alla dose di cc. 10 per kgr. d'animale.

Tutti i conigli inoculati non presentarono fenomeni tossici.

Allora ho preparato delle soluzioni più forti, sapendo che l'urea è solubilissima in acqua. Di fatti a 15° C. una parte di essa si scioglie benissimo in due parti d'acqua: e con soluzioni di questo titolo, iniettate in cinque conigli del peso medio di 1 kg., e continuate fino a provocare la morte, ho ottenuto i seguenti risultati, che riassumo brevemente.

Dopo l'iniezione di cc. 20 di liquido (pari a gm. 10 d'urea), si verificarono i primi fenomeni tossici: respiro frequente, battiti cardiaci accelerati, abbondante emissione d'urina. Dopo cc. 24 aumenta la dispnea e si ha qualche leggiera scossa. Dopo cc. 26 convulsioni tonico-cloniche, nuova emissione di urina, leggiero esoftalmo. Dopo cc. 30 (in alcuni animali dopo cc. 27 o 28, in uno solo dopo 31), convulsioni generali fortissime, esoftalmo spiccato, emissione di feci, morte in opistotono per paralisi respiratoria, mentre il cuore continua a pulsare, sebbene assai irregolarmente, finchè si arresta in diastole, dopo circa 10 minuti dalla cessazione dei movimenti respiratori.

In media adunque gr. 15 d'urea rappresentano la dose minima mortale per kgr. di coniglio.

In altri termini, il potere tossico dell'urea è di 15 per kgr. d'animale, dose evidentemente notevole, messa a confronto di quella contenuta nella corrispondente quantità d'urina (cc. 80), *trovata nella prima serie di esperienze.*

Esperienze sulla siero-immunità.

Ottenuti questi risultati, stabilito cioè che per uccidere un kg. di materia vivente, sono necessari rispettivamente cc. 80 di urina umana patologica e cc. 30 di soluzione d'urea, contenente gm. 15 di questa sostanza, non mi restava che passare alla seconda parte del mio studio.

Otto giorni dopo l'ultima inoculazione sottocutanea di urina, ho salassato i cani (carotide esterna). Raccolto asetticamente il siero, l'ho inoculato nella giugulare dei conigli, alla dose di cc. 10 per kg.

Dopo 48 ore, inoculavo negli stessi conigli urina o soluzione di urea, nella dose mortale, già stabilita.

Ho lasciato trascorrere questo periodo di tempo, per constatare in modo certo, se il siero non fosse per sè stesso tossico. I risultati furono però tutti costanti: il siero di cane, così preparato, inoculato alla dose di cc. 10 per kg., non ha nessuna azione tossica sul coniglio.

I primi risultati ottenuti furono incerti. I 4 conigli inoculati sopravvissero rispettivamente 5, 6, 8 e 9 ore. Non si ebbe quindi che solamente un ritardo nella morte, la quale sopravvenne improvvisamente, svolgendosi i soliti fenomeni dell'avvelenamento in modo quasi fulmineo, dopo trascorse quelle ore di sopravvivenza.

Pensai che una sola iniezione di siero non fosse sufficiente a immunizzare i conigli.

Praticai allora due iniezioni, sempre alla dose di cc. 10 per kg. e alla distanza di 24 ore una dall'altra, lasciando trascorrere altri due giorni dall'ultima, prima di iniettare la dose mortale di urina o di urea.

I risultati questa volta furono tutti positivi.

Trascrivo qualcuna delle esperienze fatte:

Esperienza XXI. — Coniglio di kg. 1.200. Il 3 giugno nella giugulare D. s'inoculano cc. 12 di siero. Il giorno dopo nella giugulare S. s'inoculano altri cc. 12.

L'animale non presenta alcun disturbo.

Il 6 giugno in una delle femorali s'inoculano cc. 100 di urina. Immediatamente dopo l'iniezione, l'animale si mostra alquanto abbattuto, ha un po' di dispnea, ed emette molta urina. Dopo circa 15 minuti, si dileguano questi fenomeni e l'animale ritorna vivace come prima.

8-9-10 giugno. L'animale sta bene.

Esperienza XXIII. — Coniglio di kg. 1.005.

5 giugno. Inoculazione di cc. 10 di siero.

6 giugno. Inoculazione di altri cc. 10 di siero.

8 giugno. Inoculazione di cc. 30 di soluzione d'urea.
L'animale sopravvive; nessun fenomeno.

ESPERIENZA XXV. — Coniglio di kg. 1.300.
10 e 11 giugno. Iniezione di cc. 13 di siero.
13 giugno. Iniezione di cc. 104 di urina.
L'animale sopravvive.

ESPERIENZA XXVI. — Coniglio di kg. 0.980.
10 e 11 giugno. Inoculazione di cc. 10 di siero.
13 giugno. Inoculazione di cc. 80 di urina.
L'animale sopravvive.

ESPERIENZA XXX. — Coniglio di kg. 1.010.
15 e 16 giugno. Inoculazione di cc. 10 di siero.
18 giugno. Inoculazione di cc. 30 di soluzione d'urea.
L'animale sopravvive.

La costanza di tali risultati non lasciava dubbio alcuno sulla loro interpretazione. *Si forma una vera e propria immunità contro l'azione tossica dell'urina e dell'urea; immunità, che si ottiene con inoculazioni preventive di siero di cane, preparato con la stessa urina.*

Tossicità della bile.

La bile è stata oggetto di numerose ricerche, tanto dal punto di vista fisico, chimico e crioscopico, quanto da quello battericida e antitossico.

Sul potere antitossico sono importanti alcuni lavori, pubblicati in questi ultimi anni.

Franzius (1) in un lavoro inspirato alle ricerche di Koch sul potere antitossico della bile nella peste bovina, afferma che la bile degli animali morti di rabbia contiene un'antitossina rabbica. Inoculando infatti sotto la duramadre dei conigli un miscuglio a parti eguali di bile rabbica e di emulsione di virus fisso, riuscì a salvare gli animali dalla rabbia.

La bile degli animali morti di rabbia neutralizza dunque il virus rabbico, e ciò è dovuto a un potere antitossico e non a una azione chimica, perchè la bile degli animali sani, mescolata al virus e inoculata nelle stesse condizioni, non impedisce lo sviluppo della rabbia.

Il Vallée (2), controllando le ricerche di Franzius, confermò la prima parte dei suoi risultati, ma negò recisamente la seconda. Egli infatti inoculò bile normale e virus fisso e salvò gli animali.

---

(1) *Die Galle toller Thiere als Antitoxin gegen Tollwut.* Centralb. f. Bakt. XXIII, pag. 782.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 504, 1899.

Per Vallée quindi la bile normale non si comporta diversamente dalla bile rabbica. Non si tratta perciò di un potere antitossico, ma semplicemente di un potere antisettico. Riscaldando di fatti a 110° per 10 minuti la bile rabbica e inoculandola poscia con virus fisso, gli animali non contraggono la rabbia. Il che invece sarebbe dovuto avvenire, se la bile avesse contenuto un'antitossina, perocchè questa si sarebbe comportata come tutte le altre di fronte ai processi che ne annientano l'azione.

Nessuno però di questi osservatori parla dell'azione tossica, per sè stessa, della bile sugli animali da esperimento. Il Vallée ne fa un cenno, ma soltanto incidentalmente.

Egli infatti aveva osservato che l'inoculazione sottodurale, tanto di bile rabbica che di bile normale, non è affatto innocua per l'organismo. Essa provoca molto spesso la comparsa di fenomeni gravi (coma, convulsioni epilettiformi), che terminano colla morte dell'animale, in un tempo variabile da qualche minuto a 48 ore, tanto che in una serie di esperimenti, di 13 conigli inoculati 7 morirono immediatamente. Anche l'inoculazione sottocutanea non è sempre inoffensiva: essa provoca spesso la morte dell'animale per intossicazione.

Il Franzius praticava le iniezioni sottocutanee di bile alla dose di 0.50 a 1 cmc., e quelle sottodurali alla dose di 0.2 di bile e 0.2 di emulsione di midollo allungato. Il Vallée invece alla dose di 1 a 4 cmc. sotto cute e di $^1/_4$ a $^1/_2$ cmc. nella camera anteriore dell'occhio. Tali dosi venivano inoculate preventivamente, molti giorni prima dell' inoculazione del virus rabbico.

Nessun dato preciso era quindi a mia disposizione per studiare il potere tossico della bile. Non mi restava perciò fare altro che cominciare con la dose minima di un cmc. per kgr. d'animale, inoculata direttamente nel torrente circolatorio (giugulare esterna).

Mi sono servito sempre di bile bovina. Le cistifellee, estratte dall'animale appena ucciso — previa legatura al disotto del punto di sezione — venivano tosto portate dal civico macello in laboratorio, dove la bile veniva raccolta in tubi sterilizzati, mediante aspirazione con siringa ugualmente sterilizzata.

La sua purezza dal punto di vista microbico era sempre controllata accuratamente, mediante piastre d'agar seminate con sufficiente quantità di liquido; venivano utilizzate soltanto quelle bili, che non avevano dato colture dopo 24 ore alla stufa.

Le prime inoculazioni nei conigli non mi diedero risultato alcuno. Gli animali tolleravano bene l'inoculazione, senza presentare nessun fenomeno d'intossicazione. Evidentemente la dose di 1 cmc. era troppo piccola.

Ho fatto allora inoculazioni a dosi crescenti, finchè in una serie di sei animali ho potuto costantemente stabilire che cmc. 3 di bile uccidono un coniglio del peso di 1 kgr.

In generale gli animali muoiono in convulsioni epilettiformi, che avvengono in modo rapidissimo, e che durano appena 20 o 30 secondi.

Stabilita questa dose, ho preparato i cani, che mi dovevano fornire il siero.

Le inoculazioni sottocutanee di cmc. 10 di bile non furono esenti da inconvenienti gravi. L'azione caustica della bile nel cellulare sottocutaneo dava luogo alla formazione di una vasta escara, che dopo alcuni giorni si rendeva settica, per la presenza dei germi esistenti sulla cute dell'animale e di quelli provenienti dall'aria e dal terreno.

Questa complicazione, che poteva certamente modificare i risultati dell'esperienza, mi consigliò ad abbandonare la via sottocutanea e scegliere invece quella addominale.

Tranne il dolore vivissimo accusato al momento dell'iniezione, per l'azione caustica della bile sul peritoneo, gli animali tollerarono abbastanza bene queste iniezioni, che da un minimo di cmc. 5 furono gradatamente portate a un massimo di cmc. 20, continuate per un mese e ripetute in media a tre giorni d'intervallo, una dall'altra.

I principali sintomi osservati nei cani, all'iniezione delle dosi alte, erano i seguenti: emissione di urine e di feci; spesso, ma non sempre, vomito e salivazione.

Alla fine delle iniezioni, gli animali, i quali durante questo trattamento erano andati man mano scemando di peso, erano notevolmente dimagrati, presentando un aspetto cachettico, per quanto fossero ancora voraci, come prima.

In complesso furono inoculati da 80 a 100 cc. di bile, secondo il peso dell'animale.

Otto giorni dopo l'ultima inoculazione, furono salassati i cani.

***

Le esperienze sulla siero-immunità furono fatte con procedimento analogo a quello usato per le urine.

Si praticarono due inoculazioni preventive di siero nei conigli, alla dose di cc. 10 per kgr., e alla distanza di 24 ore una dall'altra. Trascorsi due giorni dall'ultima, s'inocularono cc. 3 di bile fresca per kgr.

Tutti i conigli (in numero di 4) sopravvissero; sopravvisse anche uno, nel quale, a titolo di prova, erano stati inoculati cc. 5 per kg.

Le inoculazioni preventive adunque di siero di cane, preparato

con bile di bue, salvano il coniglio dall' intossicazione della stessa bile.

Esiste quindi anche per questo liquido organico, come per l'urina, una vera e propria siero-immunità.

***

Alla fine delle esperienze, i cani furono sacrificati e i loro reni sottoposti all'esame microscopico.

Le lesioni riscontrate in tali organi furono identiche per tutti gli animali.

Le alterazioni anatomo-patologiche erano specialmente a carico dell'epitelio dei canalicoli contorti. In alcuni punti i nuclei non presentavano alcuna alterazione, ma il protoplasma era gonfio e granuloso. In altri il nucleo appariva diminuito di volume e presentava dei contorni irregolari, mentre il protoplasma era ancora più granuloso e qualche volta trasformato in un ammasso di *detritus*.

Nei punti infine, dove l'alterazione era più profonda, i nuclei erano completamente scomparsi e il lume dei canalicoli occupato in gran parte da masse granulose, in cui si trovavano, qua e là sparsi, dei residui di cromatina sotto forma di granuli rotondi, intensamente colorati.

I glomeruli apparivano normali, solo in qualcuno si riscontravano essudati.

Nei tubi retti qualche raro cilindro granuloso, ma l'epitelio era normale.

Nesssuna reazione da parte del connettivo interstiziale, nessuna infiltrazione leucocitaria attorno alle alterazioni epiteliali descritte.

***

A quale gruppo si possono ascrivere queste tipiche alterazioni renali?

Il Lindemann (1) tentò classificare i così detti *veleni renali*, a seconda della prevalenza delle lesioni anatomo-patologiche cui danno luogo, dividendoli in tre gruppi principali.

Nel 1° gruppo l'autore comprende tutte quelle tossine, che provocano la glomerulo-nefrite come lesione essenziale, come è il caso della cantaridina, dell'acido mesereico e anche del virus scarlattinoso.

Al 2° gruppo appartengono i sali metallici e gli ossidi dei metalli pesanti, che provocano anzitutto una necrosi coagulante dei tubi contorti. Il rappresentante più tipico di questi veleni è l'acido osmico.

Il 3° gruppo infine è caratterizzato dalla vacuolizzazione e distruzione rapida delle cellule epiteliali, i cui nuclei possono conservare il loro aspetto normale per un tempo assai lungo, ciò che dif-

---

(1) *Sur le mode d'action de certains poisons renaux*. Ann. de l'Institut Pasteur, n. 2, 1900.

ferenzia nettamente questo gruppo dal precedente, dove rapida è la distruzione dei nuclei.

Tali lesioni renali sono caratteristiche delle tossine animali è vegetali, come il veleno dei serpenti, il siero d'anguilla, l'abrina, la ricina, e ultimamente il siero nefrotossico, ottenuto la prima volta dal Lindemann stesso e più tardi confermato dal Néfédieff (1).

Le alterazioni renali riscontrate negli animali, che hanno servito ai miei esperimenti, rassomigliano moltissimo a quelle di quest'ultimo gruppo; dal che si può dedurre che le iniezioni di urina e di bile determinano nei cani un avvelenamento cronico, caratterizzato da alterazioni renali analoghe a quelle dei *veri veleni renali*.

Conclusioni:

Le iniezioni endovenose di urina umana e di bile bovina determinano nei conigli la comparsa di fenomeni tossici, che terminano colla morte.

Si può conferire ai conigli l'immunità contro tale azione tossica mortale, mediante iniezioni di siero di cane, preparato con inoculazioni ripetute e gradatamente crescenti della stessa urina e della stessa bile.

***

Quale può essere il principio attivo di questo siero? Come si svolge e quale è il meccanismo d'azione di questa siero-immunità?

Ulteriori studi potranno risolvere tali quesiti,dato specialmente l'interesse che presentano oggi le diastasi e le altre sostanze specifiche del sangue, per quanto riguarda la patogenesi di numerosi processi morbosi. Solo in via d'ipotesi e per analogia con altri fatti recentemente acquistati in patologia, si potrebbe ammettere da una parte la formazione di *tossine specifiche* nel sangue dei cani, sotto l'influenza dei processi di riassorbimento dell'urina e della bile; e d'altra parte si potrebbe anche ammettere che queste tossine, inoculate col siero, determinino nei conigli la formazione di *antitossine specifiche*, che spiegherebbero l'immunità acquisita da questi animali di fronte all'azione tossica di tali liquidi organici.

Cagliari, agosto 1902.

---

(1) *Sérum néphrotoxique*. Annal. de l'Inst. Pasteur. N. 1, 1901.

Istituto d'Igiene del R. Istituto di Studi Superiori
di Firenze

Ricerche microbiologiche sull'olio di oliva

per il dottor A. R. CHIAPPELLA, assistente.

Il modo di estrazione dell'olio di oliva, così come si pratica generalmente in tutte le regioni oleicole, espone indubbiamente questo prodotto del suolo a molteplici inquinamenti per parte dell'ambiente, nonchè dell'uomo e degli animali che in esso soggiornano e si agitano per i bisogni della industria oleifera.

A dimostrare questo fatto basta una rapida descrizione della *pratica dell'estrazione dell'olio.*

Le olive, raccolte sia sulla pianta, sia sul terreno, e in generale neppure lavate e liberate dalla terra che può insudiciare quelle ravviate sul suolo, vengono portate, o direttamente o passando per locali di conservazione, al frantoio, dove sono ridotte in pasta colla macinazione. Questa per lo più si eseguisce col sistema antico consistente nell'uso di una macina di pietra messa in moto da un animale (bue o cavallo), che è aggiogato a un albero di trasmissione in immediata vicinanza della macina, dimodochè l'animale quasi viene a sfregare col fianco il piatto o pila in cui la macina infrange le olive. Tanto piccola è la distanza che separa l'animale dalla pila che non è raro il caso che questo sporga il muso su di essa per prendere una boccata di pasta di olive, di cui i bovi son ghiotti. È inutile dire che dopo 18 o 20 ore di lavoro continuato in queste condizioni, lo spazio circolare riservato alla bestia è ridotto a un vero letamaio; e non è escluso il caso che particelle di escrementi o solidi o liquidi possano arrivare proiettate fino alla pila della macina. L'uomo poi addetto alla sorveglianza dell'animale è quello stesso che impasta le olive e le caccia regolarmente sotto la macina; e certamente non si lava le mani ogni volta che deve attendere ad una tal faccenda dopo avere toccato ripetutamente o magari ripulita la bestia.

Quando le olive siano ridotte in pasta, se ne riempiono le così dette gabbie o bruscole (di giunco o di crine vegetale), che vengono portate sotto il torchio per l'estrazione dell'olio. Esse sono lavate con acqua comune, la

quale pure serve per facilitare l'estrazione dell'olio, sia di 2ª, sia di qualità inferiore, e all'uopo viene versata o sulla torre di gabbie sotto lo strettoio, fredda o leggermente riscaldata, oppure (per l'olio inferiore di rimacina o di sansa) molto calda e anche bollente sulla pasta di olive già pressata e riposta nella pila del frantoio, dove viene di nuovo rimacinata. Ora, non sempre quest'acqua è della più pura nè sempre è stata bollita prima dell'uso.

Superfluo accennare, dopo quanto ho detto, allo stato miserando del pavimento dopo una mezza giornata di lavoro in tali condizioni: terra, minuzzoli di paglia, pasta di olive, escrementi animali disseminati dalle scarpe dei lavoranti che se ne imbrattano nell'andare intorno alla pila dove gira l'animale; il tutto commisto e ridotto a una fanghiglia nerastra, untuosa; e ciò in immediata vicinanza e perfino al disopra della tinella ove cade l'olio dallo strettoio, tinella situata più in basso del pavimento al disotto di un impalcato mobile.

Finalmente, l'olio così estratto (dalla tinella ove cade mescolato coll'acqua di vegetazione propria delle olive, con quella aggiunta alla pasta, con tutte le sostanze estranee trasportate) viene raccolto in larghe conche di chiarificazione chiuse semplicemente da un coperchio di legno che ordinariamente non brilla per troppa proprietà e certo in tutti i casi non protegge gran cosa il contenuto dal pulviscolo dell'aria ambiente. Una volta chiarito, l'olio si travasa negli orci di conservazione.

L'osservazione di quanto sopra ho espresso, e che, ripeto, più o meno si verifica dappertutto dove si produce olio, mi ha indotto ad istituire una serie di ricerche dirette a studiare la flora microscopica che, compatibilmente colla sua chimica composizione, l'olio può albergare, e a mettere in chiaro per quanto tempo dei microrganismi patogeni eventualmente pervenuti nell'olio vi si conservino viventi; per potere da ciò trarre qualche pratica conclusione sulle misure igieniche necessarie a prendersi così nella fabbricazione come nella conservazione dell'olio.

Ricerche precedenti.

In questo genere di ricerche due soli sperimentatori, per quanto io sappia, mi hanno preceduto, il Binaghi cioè e il Baldassarri.

Il Binaghi (1) si era proposto di studiare se nei grassi in generale, sia di origine animale, sia di origine vegetale, potessero i germi patogeni più comuni e più importanti per noi trovare le condizioni favorevoli al loro sviluppo e se conservassero oppur no, o in caso affermativo per quanto tempo, il loro potere patogeno.

I grassi studiati dal B. furono, tra gli animali, il burro e il grasso di maiale; tra i vegetali l'olio di oliva, di sesamo, di ricino e di mandorle dolci. I microrganismi patogeni sperimentati furono lo stafilococco aureo, il B. del tifo, il fungo del mughetto, il micrococco tetrageno, il vibrione del colera; in un'ultima serie di ricerche fu da lui pure sperimentato il B. del carbonchio.

Tralasciando tutto ciò che riguarda i grassi animali e i vari grassi vegetali studiati, per limitarmi esclusivamente ai risultati dal B. ottenuti nelle sue esperienze sull'olio di oliva, dirò che nelle culture a piatto di gelatina fatte con l'olio di oliva non sterilizzato si svilupparono abbondantissime colonie di un mucor (non lo identifica), scarse colonie di un *Bacterium coli* e qualche colonia di *Sarcina alba.*

La scarsezza di specie trovate dal B. nell'olio d'oliva non sterilizzato non può derivare, secondo me, da altro fatto che dall'avere il medesimo adoperato nelle sue esperienze olio già vecchio di vari mesi forse, ossia già in gran parte depuratosi spontaneamente (vedi in seguito), o forse anche filtrato e inquinatosi poi durante la sua conservazione.

Degli animali inoculati con lo stesso olio, un solo coniglio morì dopo 13 giorni, presentando un grosso ascesso nel punto di inoculazione, dal quale fu isolato un *B. coli* che, riinoculato in cultura pura, non si mostrò virulento.

I vari germi patogeni da lui studiati poterono essere isolati dai rispettivi campioni di olio di oliva inquinato ancora dopo un mese, ad eccezione del vibrione del colera, che scarsissimo già dopo 20 giorni, in capo a un mese non si isolava più oltre.

Per il B. del carbonchio, secondo il B., già dopo il 15° giorno si comincia a notare una leggera diminuzione nel numero delle colonie, diminuzione che va facendosi sempre più sensibile finchè dopo un mese esse sono molto scemate; ma però nelle lastre se ne può sempre contare un numero maggiore di quello osservato per gli altri batteri studiati.

Dalle sue esperienze il Binaghi viene alla conclusione che i grassi non hanno una spiccata azione battericida, e che in essi i microrganismi patogeni altamente virulenti non vengono attenuati; sta però in fatto che i grassi non possono costituire un buon terreno di cultura pei microrganismi in generale, mancando essi delle sostanze atte a favorirne lo sviluppo. Per la pratica poi, egli sostiene la necessità di una rigorosa sterilizzazione dei grassi, tanto che debbano servire all'alimentazione, quanto per usi farmaceutici.

Il Baldassarri (2) studiò il contenuto microbico e la resistenza dei germi patogeni in diversi olî, quello di oliva cioè, di cotone, di sesamo, di ravizzone e di merluzzo.

In essi trovò in forte predominio gli ifomiceti, fra i quali di gran lunga il più comune era il *Penicillium glaucum*, poi un mucor (da lui non identificato), più di rado l'*Aspergillus niger*.

In tenue proporzione furono gli schizomiceti trovati; con frequenza ottenne delle Sarcine, fra cui spesso la *S. lutea* e *aurantiaca;* il B. sottile; il B. mesenterico: il *Microc. roseus*, nè più altri ne cita. Di patogeni non ne trovò mai.

Il conteggio delle colonie nelle lastre di gelatina gli diede da 6 a 575 germi per cmc., per i varî olî studiati, col minimo di 6 per l'olio di merluzzo.

Il B. poi osservò che nell'olio coll'andar del tempo impoverisce il numero dei germi esistenti, finchè si arriva ad una vera e propria sterilizzazione spontanea, che egli crede di poter spiegare coll'aumento di acidità che l'olio subirebbe col tempo. Questo almeno siamo autorizzati a credere sia il suo concetto da due accenni che egli fa in proposito: primo là dove dice che questa autodepurazione gli si mostrò più rapida per l'olio di fegato di merluzzo che per gli altri olî studiati, ciò che egli crede stare in rapporto colla constatata

maggiore acidità di quest'olio rispetto agli altri; in secondo luogo, quando espone come negli olî tenuti permanentemente in termostato i germi contenutivi si mantenevano in vita per un tempo molto più breve che negli altri conservati alla temperatura ambiente, spiegando il fatto con l'aumento del grado di acidità di essi olî dovuto alla più alta temperatura a cui erano sottoposti.

I microrganismi patogeni, il cui comportamento nell'olio fu dal B. studiato, sono lo stafilococco aureo e bianco: il B. del tifo e del *coli;* il B. del carbonchio.

Negli olî naturali i varî germi mantennero la loro vitalità per quasi due mesi (eccezione fatta pel carbonchio sporigeno, che si sviluppò ancora dopo un anno uccidendo in circa 40 ore una cavia del peso di gr. 500). Negli olî stati prima dell'inquinamento sterilizzati col calore, i varî patogeni non durarono più di una settimana: e ciò per l'alterazione che gli olî subiscono con la bollitura.

Le conclusioni a cui giunge il Baldassarri sono che gli olî del commercio contengono germi, ma quasi sempre innocui: e che i germi che vi pervengono, possono mantenere vita e virulenza per un tempo abbastanza lungo per poter essere causa di pericoli; d'onde la necessità di proteggere, per quanto possibile, tali sostanze da ogni inquinamento o altrimenti rendere innocui i germi che vi fossero contenuti.

Come si può vedere dalla precedente rassegna dei due lavori citati, il Binaghi non ebbe per principale obiettivo delle sue ricerche la flora microscopica dell'olio di oliva nè degli altri grassi studiati, ma di questa si occupò soltanto di passata, come di ricerca secondaria; ciò che sarebbe dimostrato, se non erro, dal brevissimo accenno ch'egli fa dei microrganismi trovati, che nemmeno si sarebbe curato di identificare tutti.

Per quanto riguarda la scarsezza dei reperti, ho già accennato alla sua probabile causa.

Poco di più ci dice al riguardo il Baldassarri, per il quale pure può valere del resto l'osservazione già fatta, di essersi servito di campioni di olio già in parte depurati.

Ora, quanto i due autori citati dicono intorno ai germi che si possono abitualmente ritrovare nell'olio di oliva, mi pare troppo poco; perchè, se consideriamo il modo di ottenere dal frutto dell'olivo questo importantissimo grasso, così come si pratica press'a poco dappertutto, e come appunto ho procurato di descrivere fedelmente al principio di questa nota, non possiamo a meno di presupporre in esso, per lo meno finchè è di recente estrazione, una ricca flora, sia pure costituita di tutti saprofiti (e che tali esclusivamente la costituiscano sempre è da augurarsi!), ma che pure potrebbe contare fra i tanti anche qualche patogeno, fra quelli almeno più comuni e più sparsi nell'ambiente.

FLORA MICROSCOPICA DELL'OLIO DI OLIVA, DAL MOMENTO DELLA SUA ESTRAZIONE IN POI.

Per le anzidette considerazioni ho creduto conveniente di studiare questa flora in modo sistematico; e all'uopo mi sono servito di campioni di olio di 1ª e 2ª estrazione dell'ultimo raccolto (1901-902), prelevati in recipienti sterilizzati a mezzo di pipette pure sterilizzate, direttamente da me, pochi giorni dopo essere stato l'olio immesso nelle conche di chiarificazione; quando cioè, sebbene ancor molto lontano dall'essere limpido, pure è già dato al consumo, non solo sui luoghi di produzione fra le popolazioni delle campagne (1), ma anche esitato sui mercati di città.

Il metodo generale da me seguìto è stato quello delle culture a piatto in scatole di Petri, servendomi di comune gelatina al 15 % per lo sviluppo e l'isolamento degli schizomiceti, e di gelatina acida di prugne (2) e di pane per i blastomiceti e le muffe.

Per ricerche speciali ho poi adoperato degli speciali mezzi di cultura, come i brodi lattosato e fenolftaleinizzato di Abba per il gruppo tifo e *coli*, il brodo di Dunham-Koch per il gruppo *vibrioni*, ecc., come dirò in seguito a proposito della ricerca dei patogeni.

Per le culture anaerobiche mi sono servito dei soli metodi di Liborius e di Buchner.

Dalle culture eseguite ho ottenuto *muffe* (*zigomiceti* e *forme conidiofore degli ascomiceti*); *schizomiceti* e *saccaromiceti*.

Di gran lunga predominanti su tutti si sono dimostrate le muffe, e tra esse senza paragone le forme a conidî degli ascomiceti. Nell'olio di recentissima fabbricazione ho avuto cifre di 950, 1000 e 1200 germi sviluppatisi per cmc., con una proporzione press'a poco costante di tre quinti di muffe per due quinti di batteri.

Nell'olio più vecchio (6 mesi dopo l'estrazione) ho ancora avuto da 350 a 800 germi per cmc. seminando il leggero deposito da esso

---

(1) In campagna si vedono i contadini consumare l'olio appena estratto, levandolo addirittura, torbido com'è, dalla tinella dello strettoio.

(2) Preparazione secondo Mez: Si rammolliscono delle prugne secche per 12 ore in acqua comune, si privano dei noccioli, se ne pesano 100 gr. e si fanno bollire per mezz'ora a fiamma diretta con un litro di acqua; quindi, riaggiunta l'acqua evaporata, si passa spremendo per panno. Si lascia riposare per 24 ore e si decanta; si aggiunge il 10 % di gelatina e si fa sciogliere a fiamma diretta agitando continuamente, perchè non si attacchi al fondo del pallone, portando ad ebullizione. Si lascia raffreddare alquanto e si chiarifica con un bianco d'uovo e dopo 20 minuti di bollitura si filtra, oppure lasciando depositare in termostato a 37°, si decanta. Si sterilizza nel solito modo.

olio lasciato, con una proporzione enorme di muffe, anzi talora con la quasi esclusiva loro presenza; e seminando invece l'olio perfettamente limpido senza agitarlo e avendo cura di non sollevare il fondo, ho avuto soltanto da 10 a 40 germi per cmc., di cui la massima parte, come sempre, muffe.

Questa scarsezza straordinaria di bacilli e di saccaromiceti, sporigeni e quindi resistentissimi alle nocive condizioni dell'ambiente esterno, dopo un soggiorno di 6 mesi nell'olio o meglio nel suo deposito, da me osservata quasi costantemente, è però più apparente che reale; e ciò si spiegherebbe, secondo me, colla assai maggiore proporzione numerica delle muffe rispetto ai bacilli e ai saccaromiceti, per cui seminando un po' d'olio in una lastra di gelatina, le muffe, per essere molto più numerose, prenderebbero il sopravvento e col loro sviluppo invadente impedirebbero alle spore dei secondi di germinare, o quanto meno non ne permetterebbero la constatazione. Che le cose stiano realmente così, lo dimostrerebbe la seguente osservazione costantemente fatta: se, invece di seminagioni in gelatina, io semino (metodo di arricchimento) qualche goccia di deposito dell'olio in esame in 100 cmc. di brodo semplice o anche meglio lattosato alcalino in matraccio di Erlenmeyer che porto nel termostato a 37°; ossia miglioro le condizioni per un buono sviluppo degli schizomiceti, specie dei bacilli che, come si sa, hanno alla temperatura di 37° uno sviluppo rapidissimo, estremamente rigoglioso, addirittura invadente, mentre per le muffe, a controbilanciare la favorevole influenza dell'aumentata temperatura, entra in campo il mezzo di cultura liquido e a reazione leggermente alcalina per esse poco appropriato; ottengo di far sviluppare anche i bacilli e i saccaromiceti, che poi riesco ad isolare portando un'ansa del liquido intorbidato su tubi di agar inclinato a becco di flauto, tenuti essi pure alla temperatura di 37°, o anche, semplicemente facendo dal brodo delle culture a piatto in gelatina.

I batteri dunque esistevano nel deposito dell'olio ed erano capaci di svilupparsi; ma, sopraffatti dalle muffe, non facevano in tempo a rivelarsi nelle culture in gelatina, alla temperatura di 22°; donde lo strano reperto negativo in molti casi.

***

Ecco ora l'*elenco degli organismi vegetali* (muffe e batteri) *da me rinvenuti nei vari campioni di olio esaminati.*

I. Degli *Zigomiceti* ho trovato i generi *Mucor* (Mich.) L. e *Thamnidium* Link.

1. *Mucor*. Piuttosto raro, non avendolo isolato che due volte, il *M. racemosus* Fres.

2. *Thamnidium*. Qualche rara volta ho avuto il *Th. chaetocladioides* Bref.

II. Tra le *forme conidiofore* degli *Ascomiceti* ho ottenuto i generi *Penicillium* Lk.; *Briarea* Corda; *Aspergillus* Mich.; *Sterigmatocystis* Cramer; *Oospora* Wallr.; *Sporotrichum* Lk.; *Oedocephalum* Preuss.

3. *Penicillium*. Numerosissimo sempre, tanto da invadere in breve tempo tutta o quasi la superficie delle lastre di gelatina, non solo su terreno acido più adatto, ma anche su mezzo neutro, e costituente la proporzione numerica di gran lunga maggiore, è risultato il *P. glaucum* Lk.; abbastanza frequente, sebbene in grado infinitamente minore come numero, il *P. italicum* Weh.; rari il *P. brevicaule* Sacc. (isolato due sole volte) e il *P. luteum* Weh. una volta.

4. *Briarea*. Frequentissima anch'essa, col *P. glauco*, la *B. orbicula* Bon.

5. *Aspergillus*. Con notevolissima frequenza ho isolato l'*A. herbariorum* Schrt.; di rado l'*A. roseus* Lk. (poche volte) e più di rado ancora (una volta ciascuno) l'*A. flavus* Lk. e l'*A. clavatus* Desm.

6. *Sterigmatocystis*. Abbastanza frequente la *S. nigra* van Thieg. (l'*Aspergillus niger* degli autori).

7. *Oospora*. Due volte ho trovato l'*O. gummigena* Sacc. et Vogl.

8. *Sporotrichum*. Una volta trovai lo *S. lactis* Pir. et Rib.

9. *Oedocephalum*. Varie volte ottenni l'*Oed. roseum* Cooke e l'*Oed. fimetarium* Sacc.

Fra queste muffe meritano speciale menzione il *Pen. glaucum*, l'*A. flavus* e la *Sterigmatocystis nigra*, perchè dotate di proprietà patogene e più particolarmente tossiche per gli animali superiori e per lo stesso uomo.

III. Degli *Schizomiceti* ho trovato rappresentate abbastanza largamente *Coccacee* e *Bacteriacee*.

Fra le prime i generi *Sarcina* Goodsir. e *Micrococcus* Cohn.

10. *Sarcina*. Le sarcine furono molto rare: soltanto una volta ho isolato la *S. rubra* Frosch. et Kolle, e un'altra volta pure la *S. erythromyxa* Kràl.

11. *Micrococcus*. Numerosissime colonie ho sempre avuto in tutti i campioni esaminati; e si comprende facilmente la loro frequenza, quando si tenga conto della loro diffusione negli ambienti naturali, specialmente nell'aria, donde indubbiamente deve provenire all'olio la maggior quantità di essi.

Dei cocchi debbono essere ricordati primi fra tutti due patogeni da me trovati due volte: il *M. pyogenes aureus* (Ros.) L. et N. e il *M. pyogenes albus* (Ros.) L. e N., cioè i due cocchi piogeni più comuni, lo stafilococco aureo e il bianco, che si mostrarono tipici.

Frequentissimi poi furono il *M. candicans* Flügge; il *M. cremoides* Zimm.; il *M. luteus* Cohn; il *M. roseus* Fl.; più rari il *M. sulfureus* (Zimm.) L. et N. e il *M. coronatus* Fl.

Delle Bacteriacee erano press'a poco egualmente rappresentati i due generi, *Bacterium* e *Bacillus*.

12. *Bacterium*. Fra questi ho isolato un fluorescente non fluidificante che ho identificato col *B. immobile* Mez (= *Bac. fluorescens non liquefaciens* Eisenberg; *Bac. XII.* Dittrich); due cromogeni, il *B. roseum* Mez (= *B. mycoides roseum* Scholl) e il *B. helvolum* (Zimm.) L. et N.; e finalmente, il più importante di tutti, un batterio in tutto simile al *B. margarittaceum* Mig., più importante degli altri saprofiti accennati per il gruppo cui apparterrebbe, che sarebbe quello del *B. coli* e del *B. aërogenes* (Kruse) L. et N.

Esso si presenta come un bastoncino cortissimo, tozzo, immobile, a estremità arrotondate, isolato o in gruppi di due individui, che si colora facilmente coi soliti metodi e non resiste al metodo di Gram.

In cultura a piatto in gelatina, le colonie profonde sono sferiche, giallastre, granulose; le superficiali hanno forma di dischi assai rilevati, di colore bianco di porcellana, a centro depresso, ombellicato. Non fluidifica la gelatina.

In cultura per infissione in gelatina si ha rigoglioso sviluppo tanto in superficie che lungo il canale d'infissione: in superficie si nota una patina tondeggiante, bianca, rilevata: lungo il canale si formano tante colonie rotonde, più o meno isolate, a guisa di rosario, biancastre; si ha formazione di bolle di gas.

Su agar per strisciamento dà luogo a una patina biancastra assai rilevata. con formazione di gas specialmente accentuata al fondo del tubo, dove il terreno nutritivo si vede entro le 24 ore profondamente screpolato.

In brodo intorbidamento generale, rapido, con forte deposito al fondo.

Nel latte, a differenza del *B. aërogenes* e del *B. margarittaceum* descritto dal Migula, che coagulano ambedue rapidamente in prima o in seconda giornata, la coagulazione avviene molto tardi e incompleta, non prima di 8-10 giorni, con reazione acida non molto spiccata.

Su patata, si forma una patina cremosa giallo-biancastra. Non ho osservato sviluppo di bollicine di gas dalla cultura, a differenza dei due citati microrganismi.

Scompone attivamente lo zucchero d'uva; produce acidi, gas; non indolo, nemmeno per tracce.

Non è patogeno, nè gode di proprietà tossiche. L'inoculazione nella cavità addominale della cavia di 3 cmc. di brodo-cultura recente, pura, non

mi diede nessun risultato, come eguale risultato negativo ottenni con l'inoculazione diretta dell'olio.

Per tutti questi caratteri e nonostante le piccole differenze notate riguardo alla lenta coagulazione del latte, la minor produzione di acido, il mancato sviluppo di gas sulla patata, io credo di poter ritenere questo batterio per il *B. margarittaceum* di *Migula*. Ora, quest'ultimo, e per i caratteri morfologici e culturali e per le proprietà biologiche, si rassomiglia in tutto e per tutto al *B. aërogenes*, essendo solamente, a differenza di quest'ultimo, privo di ogni proprietà patogena e tossica.

Orbene, nulla si oppone a ritenere che questo *B. margarittaceum* possa essere appunto il *B. aërogenes*, proprio della flora batterica intestinale e da essa pervenuto nell'ambiente, dove avrebbe perduto il suo potere patogeno e tossico, riducendosi a vita puramente saprofitica. E nella sua origine appunto, dal *B. aër.* della flora intestinale, starebbe la importanza dell'accennato saprofita, come quello che dimostra un inquinamento con materie fecali, che potrebbero in certi casi essere pericolose d'infezione.

13. *Bacillus*. Le cinque specie riscontrate erano di gran lunga più numerose che non le specie del gen. *Bacterium* in tutte le culture, ciò che si può spiegare con la loro resistenza enormemente maggiore in dipendenza della facoltà di sporulare.

Le specie identificate sono: il *B. subtilis* Cohn; il *B. megatherium* De B.; il *B. vulgatus* Mig.; il *B. implexus* Zimm. e il *B. subtiliformis* Schrt. nelle sue due varietà: *radicosus* Zimm., e *ramosus* (Frkl.) Mig.

IV. 14. Fra i *Saccaromiceti* ho isolato frequentemente il *Saccharomyces ellipsoideus* Reess.; il *S. cretaceus* Mez; il *S. membranifaciens* Hansen e il *S. rosaceus* Frankl.

Da questa enumerazione risulta adunque che sono 14 i generi di funghi (tra muffe, batteri e fermenti) *trovati nell'olio di recente estratto, appartenenti a varie classi e rappresentati da ben 39 specie diverse.*

Nella grandissima loro maggioranza tutti questi funghi sono semplicemente saprofiti e dei più comuni a incontrarsi nell'ambiente; qualcuno soltanto è dotato di proprietà patogene o tossiche.

Il modo del loro pervenire nell'olio non ha bisogno di ulteriori spiegazioni, dopo quanto ho detto in principio.

La loro presenza poi nell'olio, a parte ciò che riguarda i patogeni e i loro pericoli, costituisce sempre un grave inconveniente, per i processi di fermentazione e di scomposizione, cui molti saprofiti e specialmente i fermenti dànno luogo in seno alle sostanze

dall'olio depositatesi, mettendo in pericolo la buona conservazione di questo grasso.

Nè si creda che questi reperti così copiosi siano eccezionali e dovuti al fatto dell'aver io prelevato i miei campioni d'olio da un frantoio della peggiore specie ed eccezionalmente mal tenuto. Ora, ciò non è affatto; e mi spiego. Il frantoio, da cui ho ricavato gli oli che mi hanno servito per questo studio, è realmente fatto all'antica, con tutti gl'inconvenienti da me in principio esposti, cioè con la presenza, nello stesso locale di lavorazione, dell'animale che fornisce la forza motrice alla macina e in immediata vicinanza e contatto con quest'ultima; col locale di chiarificazione in comunicazione immediata con quello di lavorazione, e quindi esposto a un gran tramestio e spolverio, i due locali poco arieggiati, scarsamente illuminati, ecc., ecc.; ma gli inconvenienti suddetti sono compensati in parte non piccola dalla conseguita osservanza di molte norme di pulizia, che non si trovano facilmente messe in pratica altrove, fra le quali citerò il lavaggio a grand'acqua delle olive raccolte sul suolo, in modo da portarle alla macina perfettamente ripulite dalla terra che ad esse aderiva; il lavaggio di tutti gli utensili e le macchine dell'oleificio (macina e pila, lucerna dello strettoio, gabbie, barellini, conche, orci, fiaschi, nappi, ecc.) con una soluzione bollente di carbonato sodico al 5-10 $^{o}/_{o}$ e risciacquamenti ripetuti con acqua bollente di buona qualità; accurata pulizia di tutto il locale prima e durante la lavorazione, in modo da evitare per quanto possibile sollevazione di polvere, ecc., ecc. Pratiche tutte che, oltre ad avere la loro utilità per ottenere un buon prodotto, non possono mancare di portare piuttosto una diminuzione che un aumento nel numero dei germi, che per il fatto della lavorazione perverranno nell'olio. I miei reperti dunque non si possono dire nè eccezionali nè esagerati.

***

L'olio adunque si presta molto ad inquinamenti, inevitabili specialmente nel processo della sua estrazione dal frutto. Ma fortunatamente, *per quanto facile ad inquinarsi, è quasi altrettanto facile a depurarsi per uno spontaneo processo più fisico e meccanico, secondo me, che non chimico.*

Già il Baldassarri aveva notato che, conservando l'olio in recipienti sterilizzati in luogo fresco ed oscuro e da esso rinnovando le culture dopo vario tempo, i germi contenutivi subivano una costante diminuzione; la scomparsa completa ne era però lentissima, tanto

che dovevano passare molti mesi prima di arrivarvi, gli ultimi a scomparire essendo naturalmente i germi sporigeni.

Così avviene infatti; ma per quale processo, fisico o chimico? Non mi soddisfa la spiegazione che ne vuol dare il Baldassarri stesso coll'invocare il grado di acidità dell'olio, grado che anderebbe aumentando col tempo; non mi soddisfa, poichè questa causa di autodepurazione non dovrebbe mai entrare in azione in un buono olio di oliva che dev'essere di reazione *perfettamente neutra* e che pur tuttavia si depura e alla fine si sterilizza completamente (1). Così è avvenuto nelle esperienze da me fatte al riguardo con gli stessi campioni di olio che, subito dopo la sua estrazione, mi avevano servito per lo studio della flora microscopica, come ho dianzi esposto. Premetto che la reazione dei vari campioni si è mantenuta (conformemente a ciò che avviene nelle condizioni naturali, osservando certe precauzioni, e che costituisce un soggetto di gran cura per parte degli industriali) perfettamente neutra.

In tali condizioni le varie seminagioni in gelatina a piatto eseguite dopo tre mesi dalla raccolta mi hanno dato per risultato una già sensibile diminuzione del numero dei microrganismi, diminuzione verificatasi tutta alle spese dei germi non sporigeni, i quali non durano nell'olio più di tre mesi: invariato restando il numero e il rigoglio di sviluppo delle muffe e degli sporigeni; ripetute le culture dopo sei mesi dalla raccolta dell'olio (il quale aveva avuto nel frattempo modo di spogliarsi in grado molto alto e tirarsi a limpidezza), con l'avvertenza di far delle seminagioni di olio degli strati superiori, ben limpido e possibilmente senza agitarlo, e delle seminagioni di olio del fondo col relativo leggero deposito da esso lasciato, ho avuto i seguenti risultati: per l'olio limpido e prelevato dagli strati superiori, da 10 a 40 (al massimo) colonie per cmc. (eseguito il conteggio in 7ª od 8ª giornata), in molti casi esclusivamente di muffe o talora con una piccolissima proporzione di bacilli e fermenti; per lo stesso olio, agitato prima della prelevazione per

(1) I grassi freschi, a qualsiasi specie appartengano, possono contenere, insieme ai trigliceridi neutri degli acidi grassi, soltanto in minime proporzioni degli acidi grassi liberi, tantochè la loro reazione, saggiata coi metodi usuali delle cartoline di tornasole, si mostra neutra. Se poi, durante la loro conservazione, questi acidi grassi aumentano, allora il grasso inacidisce; e ciò accade specialmente per l'azione contemporanea della luce e dell'ossigeno, mercè cui i grassi si scompongono con formazione di acido oleico libero, secondo Bondzynski e Rufi, di ossiacidi grassi, secondo Duclaux e Späth. Altre cause di inacidimento son date dall'attività dei batteri pervenuti nei grassi e finalmente dall'azione di certi fermenti capaci di scomporre i grassi, fermenti che si trovano sui frutti delle piante oleifere (Siegmund).

la semina, ho trovato cifre di 350-400 germi per cmc.; finalmente il suo deposito seminato in scatole di gelatina dava fino a 850 colonie per cmc.

L'olio limpido adunque (*non il suo deposito*) dopo sei mesi circa dalla sua estrazione si mostra quasi completamente depurato, pure avendo conservata la sua reazione neutra.

Ma ho voluto fare anche la prova inversa, saggiare cioè il contenuto in germi di un olio spontaneamente inacidito: epperò ho eseguito delle culture con un campione di olio di infima qualità, proveniente dal deposito solido che dallo strettoio passa nell'olio e poi da questo si separa, contenendo però ancora una certa quantità di olio rinchiuso tuttavia nelle cellule del tessuto del frutto, dalle quali soltanto si libera o col tempo mediante i processi più sopra accennati di fermentazione, o molto più presto artificialmente con l'ebullizione di tale deposito, che in lingua tecnica porta il nome di *morchia*.

Quest'ultima adunque io avevo raccolto sei mesi prima in un recipiente sterilizzato a mezzo di pipetta pure sterilizzata, prelevandola da una conca di chiarificazione, dopo estrattone l'olio limpido sopranuotante; dimodochè non raccolsi altro che puro deposito, poltiglia cioè assai densa, acquoso-oleosa. Ora, trovando adatte condizioni fisiche, questa morchia, costituita da tutti i detriti del frutto, dalle materie albuminoidi e mucillagginose dell'oliva, dai frammenti di foglie stritolate, da tutte le impurezze capitate nell'olio durante l'estrazione, dall'acqua di vegetazione delle olive e da quella stata aggiunta per provocare la separazione dell'olio di rimacina; essendo ricchissima inoltre di microrganismi, ha subìto lo stesso processo di fermentazione e di acidificazione che subisce in condizioni naturali nel così detto *inferno dei frantoj*; in seguito a ciò la poltiglia primitiva si è divisa in due strati ben distinti, uno superiore costituito dall'olio limpido, verdognolo, separatosi dagli elementi del frutto per fermentazione, e uno strato inferiore costituito da tutte le sostanze estranee suddette. Naturalmente, la reazione della morchia è divenuta *fortemente acida*, come pure acido in grado non indifferente si è fatto l'olio separatosi dalla morchia (2.38 % di acidità espressa in H^2SO^4).

Nè sarà superfluo il far qui notare come, dovendosi in questo caso speciale mio (materiale tenuto in un recipiente a collo lungo e a bocca assai stretta e ben chiuso, mantenuto costantemente allo oscuro e in luogo fresco), escludere l'azione della luce, dovendosi ritenere limitatissima l'azione dell'ossigeno, si debba giudicare pre-

cipua causa di questa fermentazione e di tale inacidimento appunto l'attività batterica, la quale agisce scomponendo l'olio. Ma questa attività batterica, è bene osservare, si esplica soltanto quando i batteri dispongono dei materiali nutritivi a loro più necessarî (v. Sommaruga); e questa condizione precisamente si ha, nè migliore potrebbe trovarsi, nella morchia dell'olio, la quale contiene, oltre al resto, tutte le sostanze azotate dell'oliva.

Le culture a piatto in gelatina, adunque, fatte con questo campione fortemente acido mi hanno dato per l'olio limpido prelevato con cura, senza scuotere e senza aspirare menomamente la morchia, un numero di colonie oscillante da 150 a 300 per cmc., circa un mese più tardi da 50 a 120, sempre con predominio di bacilli e fermenti sulle muffe; mentre la morchia prelevata dal fondo del recipiente mi ha dato costantemente per risultato delle cifre enormemente superiori a quelle trovate perfino nell'olio di recente estratto e nel suo deposito. Infatti, in varie prove ripetute ho ottenuto talora da 4800 a 6000 germi per cmc., fra muffe e batteri, con una proporzione in media del 65 per cento di muffe contro il 35 per cento di schizomiceti e fermenti sporigeni; altre volte poi le cifre calcolate (a conteggio dovuto eseguire non oltre la terza o quarta giornata) sono state enormemente superiori a queste, avendomi dato in generale sui 30 mila germi per cmc., nel qual caso va fatta menzione chè le muffe erano straordinariamente scarse, ridotte a una proporzione insignificante, locchè spiega l'enorme cifra trovata di schizomiceti e saccaromiceti: la mancanza cioè quasi completa di muffe permettendo a tutti questi germi di svilupparsi liberamente e di non restare mascherati dall'invadente sviluppo del micelio delle prime, che viceversa, negli altri casi, con la loro forte proporzione (di due terzi e più) prendevano fin dal primo momento il sopravvento sui secondi.

Ora, come si può spiegare questo reperto?

Evidentemente, la sterilizzazione non solo non si è avuta, ma al contrario il numero dei germi nel deposito è enormemente aumentato, e nell'olio stesso ha raggiunto cifre superiori a quelle offerte dagli olî di buona qualità. Ma bisogna pur notare che tutti questi germi sviluppati a migliaia e decine di migliaia son tutti organismi sporigeni, siano essi muffe o schizomiceti o saccaromiceti; sono cioè organismi dotati, allo stato di spora, di una enorme resistenza alle più nocive condizioni dell'ambiente esterno; per cui hanno potuto benissimo sopportare un lungo soggiorno in un mezzo fortemente acido senza venire nonchè distrutti, neanche ritardati nella loro ca-

pacità di germogliamento e di sviluppo (1). Gli unici germi distrutti sono stati i non sporigeni, dei quali in nessuna delle fatte culture mi è più stato possibile trovar traccia; ma per questi già abbiamo visto che basta un soggiorno di circa tre mesi in olio anche neutro per vederli scomparire totalmente. Dunque non è il caso di invocare a spiegazione della loro scomparsa la forte acidità del campione d'olio in questione.

Ma il numero enorme delle colonie sviluppatesi svela un altro fatto: e cioè l'avvenuta moltiplicazione dei germi contenuti primitivamente nell'olio e nel suo deposito. Ora, ciò trova la sua spiegazione nella composizione chimica della morchia, la quale, come ho detto precedentemente, contiene, oltrecchè tutti i detriti e le sostanze estranee all'olio, tutte le materie albuminoidi e mucillagginose dell'oliva precipitate dall'olio in cui erano in sospensione, venendo perciò a costituire un vero e proprio substrato nutritivo adattatissimo per lo sviluppo e la moltiplicazione dei microrganismi presenti; i quali intanto, o da soli come nel presente caso speciale, o in unione alle cause fisiche sopra rammentate, come per lo più succede nella pratica, provocano con la loro attività fermentazioni e scomposizioni nel mezzo stesso e l'inacidimento suo e dell'olio che se ne separa, rendendo allora in realtà, quando sia raggiunto un certo grado, improprio tale ambiente al loro ulteriore sviluppo; donde la scomparsa delle forme vegetative, restando però in enorme quantità le forme durevoli, le spore.

Giunti a questo punto, se noi facciamo delle culture, è naturale che otteniamo le altissime cifre dianzi riportate; le quali stanno apparentemente contro il concetto di un'azione depuratrice da ascriversi all'acidità del mezzo.

Eppure, non si può ragionevolmente negare che, da un certo grado in poi, l'acidità sopravvenuta nell'olio possa e debba esercitare un'azione depuratrice sul medesimo, distruggendo o da sola o in unione con altre cause i microrganismi (forme vegetative) in esso eventualmente pervenuti e anche sviluppatisi, ciò che appunto succedeva negli olî tenuti dal Baldassarri in termostato.

E che realmente sia così, lo dimostra la seguente esperienza: Separato dal suo deposito di morchia l'olio acido limpido e travasato in un matraccio sterilizzato, vi seminai in quantità, stemperandovi accuratamente la patina di una cultura su patata, il B. prodigioso.

(1) Riguardo ai saccaromiceti, poi (per alcune specie almeno), oltre alla forma durevole (*clamidospora*), va tenuta in considerazione anche la loro resistenza per un tempo lunghissimo in mezzo acido (Cfr. Duclaux).

Dopo 24 ore ne feci due culture su lastra di gelatina, ottenendo in meno di 24 ore sviluppo di innumerevoli colonie con fluidificazione completa della gelatina; culture fatte dopo 48 ore già mostravano un ritardo nello sviluppo, poichè dopo 18 ore non si vedeva ancora nulla nè ad occhio nudo nè al microscopio e solo dopo 42 ore si aveva la fluidificazione, e non completa, della gelatina; finalmente, culture eseguite dopo 4 giorni dall'avvenuto inquinamento non permettevano più di isolare il B. prodigioso, se si aveva cura di seminare del detrito finissimo di patina culturale stemperata nell'olio; chè se si rendeva qualche frammento di cultura rimasto più grosso e più spesso, si otteneva ancora dopo una settimana uno sviluppo rigoglioso del batterio in questione, sebbene con ritardo sempre più marcato; e la formazione del pigmento rosso si compieva ancora normalmente; oltre i 16 giorni, infine, non si aveva più nessuno sviluppo nemmeno dai grumi di cultura più grossi.

Resta dunque effettivamente dimostrato che l'*acidità dell'olio ha azione battericida;* ma, siccome una reazione acida l'olio non l'ha che quando sia alterato o di infima qualità, in ogni caso quando non è più atto al consumo alimentare, e d'altra parte l'autodepurazione si compie invece allo stesso modo, nello stesso tempo e con la stessa energia così negli olî acidi come in quelli neutri, perciò essa non si può invocare se non come causa secondaria di tale processo.

Un'altra causa, di ordine chimico pur essa, e che a maggior ragione (perchè costantemente presente) si può invocare a spiegazione parziale del fatto dell'autodepurazione dell'olio, sarebbe la *costituzione chimica dei grassi in generale* (Manfredi, Binaghi) e quindi anche dell'olio di oliva. I grassi, cioè, essendo corpi ternarî per la loro composizione chimica risultante dalla combinazione di C, H, O, sono terreni non adatti allo sviluppo e alla permanenza nel loro seno dei microrganismi, perchè mancano di quelle sostanze albuminoidi e saline, che sono necessarie alla vegetazione dei batterî. Così, per esempio, l'olio di oliva consta, secondo Lefort, di 77.26 % di carbonio, 11.45 % di idrogeno e 11.29 % di ossigeno, essendo andate completamente perdute nel deposito da esso separatosi le sostanze azotate e saline che entrano nella composizione dell'oliva, in proporzione variabile, secondo il Bechi, dall'1.57 al 2.98 % di azoto, dal 3 al 13.27 % di ceneri.

È ovvio comprendere che in tali condizioni di ambiente, i microrganismi in generale non abbiano che scarse possibilità, così di sviluppo come anche di una lunga resistenza; restando così spiegato il perchè della scomparsa, in un tempo che oscilla sui tre mesi, dei

germi non sporigeni dall'olio appena estratto; termine che viene ancora abbreviato e ridotto sui due mesi circa per l'olio più vecchio e depurato, ossia sempre più povero di sostanze eterogenee che possono costituire un substrato nutritivo pei microrganismi.

Ma, la causa precipua del fenomeno dell'autodepurazione dell'olio, quale ce la dimostrano l'osservazione pratica giornaliera e le dirette esperienze surriferite, consiste nella *sedimentazione*.

È nota l'efficacia di questo processo per diminuire enormemente il quantitativo in germi di un dato liquido, è nota l'importanza della sedimentazione nell'autodepurazione delle masse d'acqua. Lo stesso deve dunque succedere per l'olio: noi vediamo infatti che questo grasso, appena estratto, è torbido e tiene in sospensione infinite particelle di sostanze estranee.. Gran parte di queste impurezze si depositano nei primi giorni della chiarificazione; ma con ciò l'olio è ben lontano dall'essersi fatto limpido e depurato: esso dura ancora a lungo a mostrarsi opalescente e per lunghi mesi continua ad abbandonare particelle di sostanze eterogenee; tantochè è pratica assolutamente necessaria per una buona conservazione dell'olio il travasarlo almeno due volte nell'anno, allo scopo di evitare colle fermentazioni del deposito il guasto del prezioso grasso.

Ora, questa lenta e continuata sedimentazione di finissime particelle è appunto quella che depura l'olio anche dei germi in esso sospesi, precisamente come avviene in qualsiasi altro liquido, insieme al diretto depositarsi di una parte dei microrganismi sforniti di mobilità, che certamente ha luogo; ed è perciò appunto che noi possiamo vedere, con le seminagioni di olio prelevato da vari strati di uno stesso campione, la progressiva diminuzione di germi negli strati superiori sempre più limpidi, contro le altissime cifre ottenute seminando l'olio degli strati profondi occupati dal suo deposito.

Una nuova prova in appoggio ce l'offrono i risultati delle culture fatte con l'olio inacidito, tenuto per sei mesi sul suo deposito. Abbiamo infatti veduto dalle seminagioni fatte con olio limpido, che questo ha presentato un contenuto in germi di poche centinaia al massimo per cmc., quantità minima in paragone delle migliaia e decine di migliaia di germi esistenti per cmc. nella morchia: dunque la stessa causa depuratrice, la sedimentazione, agisce anche qui, come negli altri campioni di olio di buona qualità e di reazione neutra, indipendentemente dall'acidità del mezzo.

Nè deve far meraviglia il fatto che ancora dopo 5 e 6 mesi dalla avvenuta raccolta della morchia, si trovi nell'olio limpido da essa separatosi un contenuto in germi di varie centinaia per cmc., mentre

negli altri olii di buona qualità abbiamo avuto cifre insignificanti di poche diecine: tale reperto si spiega facilmente, poichè è troppo naturale che un olio quale è quello ricavato dalla morchia per fermentazione (vero *olio di inferno*) sia da una parte più carico di sostanze eterogenee e perciò più lungo a spogliarsi, e d'altra parte, data la grande moltiplicazione di germi nel suo seno avvenuta, più a lungo duri la loro presenza in esso, collegata al maggior quantitativo di impurezze e alla protratta sedimentazione.

E non si obietti che qui la sedimentazione non ci ha nulla che vedere, essendo il fatto naturalmente spiegabile con l'avvenuta moltiplicazione dei germi nella morchia, terreno ad essi favorevole, mentre l'olio limpido offriva loro condizioni di ambiente sfavorevoli: d'onde la differenza notata nelle rispettive cifre.

A tale obiezione risponderò ricordando i termini in cui il fatto si è avverato.

La moltiplicazione dei germi si è compiuta nel deposito appena raccolto, quando esso si trovava nelle condizioni da me sopra accennate, formando cioè un miscuglio in cui non si poteva gran cosa distinguere l'olio dalla morchia, ma anzi il primo era ancora in gran parte racchiuso nella trama del tessuto della polpa. Moltiplicatisi enormemente in tali condizioni i microrganismi nel deposito, hanno dato luogo alla fermentazione di esso, d'onde la liberazione dell'olio dalle maglie del tessuto e la sua separazione dalla morchia; in questo momento il contenuto in germi dell'una come dell'altro doveva essere necessariamente press'a poco eguale. A questo punto comincia a inacidire il mezzo in seguito ai processi di scomposizione dei trigliceridi neutri costituenti l'olio, e con l'inacidimento del mezzo vanno a scomparire tutte le forme vegetative, restando le sole forme durevoli; l'attività batterica necessariamente cessa, la fermentazione pure con essa, il miscuglio di olio e morchia a poco a poco si divide in due strati sempre più differenziati, di olio sempre più limpido in alto, di vera e propria morchia bruna e fetente in basso. Le forme durevoli, le spore dei microrganismi, che finora si trovavano press'a poco uniformemente distribuite, non possono certo soffrire nell'olio limpido più che nella morchia; dunque, se nel primo diminuiscono di numero fino a scomparire, mentre nella seconda si ritrovano sempre a migliaia, vuol dire che dall'olio scompaiono per sedimentazione.

Da quanto ho detto sopra, a proposito della composizione chimica dell'olio e della sedimentazione che in esso avviene, emergono

chiaramente due fatti che hanno la loro importanza dal lato industriale, nonchè igienico:

1. *Come sia pericoloso un forte contenuto in microrganismi per la buona conservazione dell'olio, a causa delle alterazioni che essi possono provocare.*

2. *Che questo grasso si trova in ottime condizioni per potersi conservare libero da inquinamenti di origine batterica, purchè si osservino certe norme di facile esecuzione.*

Esperienze sulla resistenza dei più comuni microrganismi patogeni nell'olio.

Le considerazioni suesposte, derivanti dall'esame e dalla discussione dei risultati ottenuti con le esperienze finora eseguite, mi portavano naturalmente a studiare in via sperimentale quale fosse la resistenza dei germi patogeni in tale mezzo, ossia in altri termini, per quanto tempo dopo un inquinamento di data sicura si potessero ritrovare ancora viventi questi stessi germi nell'olio.

Il quesito non è certamente privo di importanza dal lato igienico, essendo l'olio di oliva un grasso alimentare di primo ordine, specie per le nostre regioni, il quale in grandissima parte va consumato così come l'industria ce lo fornisce, ossia crudo, ben di rado filtrato, frequentemente appena chiarificato, ben lontano quindi dall'essersi depurato completamente.

Si è visto più sopra, a proposito dei saprofiti ritrovati nell'olio di recente estrazione, che i germi non sporigeni scompaiono da esso in un periodo di poco più che due mesi. Press'a poco lo stesso adunque si potrebbe *a priori* ritenere che succeda dei patogeni non sporigeni, tanto più quando si tenga conto delle condizioni speciali dell'ambiente in cui verrebbero a trovarsi, condizioni che, già sfavorevoli, come si è visto, pei comuni saprofiti, tanto più debbono esserlo pei patogeni, dotati in genere di maggiori esigenze. L'esperienza dimostra come questa supposizione non si allontani dal vero.

Già il Binaghi e il Baldassarri poterono constatare la relativamente poca resistenza dei comuni microrganismi patogeni nell'olio di oliva; assegnando loro in generale il primo una durata di poco più che un mese, mentre il Baldassarri giungeva a dimostrarli per circa due mesi. La differenza fra questi risultati non è grande; nè dai loro discordano quelli da me ottenuti.

La tecnica da me seguita è stata la seguente: preparavo delle culture su agar inclinato a becco di flauto dei patogeni che volevo studiare: quindi, ottenuto un buono sviluppo, in genere dopo 48 ore, raschiavo leggermente, con una spatolina di platino sterilizzata, la patina di cultura, facendo bene attenzione a non asportare insieme del terreno nutritivo; e, ottenuto così il materiale necessario, lo stemperavo nel modo migliore che mi fosse possibile in una certa quantità di olio non sterilizzato raccolto in matraccino di Erlenmeyer sterilizzato. Quest'ultima operazione non è certamente tanto facile ad eseguirsi alla perfezione, perchè, per quanto si faccia, non sempre si riesce a stemperare esattamente tutti i grumi di patina culturale umida in un mezzo così improprio come è l'olio, ma ne restano quasi costantemente di quelli più o meno grossi (specialmente se insieme alla patina culturale si è asportato inavvertitamente qualche frammento del substrato nutritivo), che vanno al fondo immediatamente e che servono ben presto di terreno alle muffe per impiantarvisi sopra e svilupparvi tutt'attorno il loro micelio sterile, che talora ho visto prendere delle notevoli proporzioni. Così protetti dall'azione dell'olio e al caso anche provvisti di qualche pochino di materiale nutriente, avviene che i microrganismi si conservino in vita per un tempo assai più lungo che non quelli stati ben distribuiti; così ad esempio, in un campione di olio inquinato con *B. coli* trovai ancora, dopo tre mesi, questo microrganismo vivente e con i suoi caratteri morfologici e biologici perfettamente conservati, presentando soltanto dopo tale periodo di tempo la maggior parte delle colonie ottenute una forma atipica, quando seminavo appunto i grumi di cultura inglobati dalle muffe (1); mentre nell'olio non mi è stato più possibile, come negli altri, così nemmeno in questo campione ritrovare il *B. coli* dopo 40-45 giorni dall'avvenuto inquinamento. Questa circostanza adunque potrebbe costituire una causa d'errore, di cui è da tener conto: avendo però l'avvertenza di non scegliere per le seminagioni appunto di tali grumi, questo inconveniente non è grave.

Con l'olio così preparato, facevo a dati intervalli di tempo (per lo più di 5 o 8 giorni) delle culture, da cui isolavo il microrganismo patogeno in esame, così continuando finchè il risultato negativo di varie prove successive non stesse a provare l'avvenuta morte di esso.

L'olio da me adoperato per queste ricerche era, ho detto, olio di oliva allo stato naturale, ossia tale quale era stato ricavato dal frutto, e ciò ho fatto ad arte, per due motivi: prima di tutto, per mettermi nelle condizioni naturali, quali troverebbe un germe patogeno pervenuto casualmente nell'olio, dove verrebbe a trovarsi insieme con altri microrganismi svariati, subendone un'eventuale influenza; in secondo luogo, perchè la sterilizzazione per mezzo del calore mi avrebbe alterato i caratteri dell'olio, il quale, come è noto, se venga sottoposto a una temperatura di 100°, già irrancidisce, diventando perciò ancora più improprio di quanto normalmente non sia, alla vita dei microrganismi. In tali condizioni, i risultati che si otterrebbero, non corrisponderebbero al vero; fatto questo già notato dal Baldassarri.

---

(1) Seminagioni fatte dopo 114 giorni non mi permisero più di isolare il *B. coli* neanche dai grumi di cultura.

Le mie ricerche concernono i più comuni patogeni, e cioè: Stafilococco aureo; Streptococco piogene; Bacillo piocianeo; B. tifico e *B. Coli*; Vibrione colerigeno; Carbonchio sporigeno. Ho voluto pure studiare, fra i non patogeni per l'uomo (almeno per quanto ancora si crede oggi) il B. pseudotubercolare del latte, il *Mycobacterium lacticola* var. *β perrugosum* L. et N., isolato dal burro di Firenze e gentilmente fornitomi dall'amico e collega dott. Foà.

Per tutti questi microrganismi artificialmente introdotti nell'olio, dirò qui che, alla stessa guisa di quelli pervenutivi naturalmente nel processo di fabbricazione, non potevano sfuggire alla sedimentazione, in conseguenza della quale qualunque coltura eseguita con l'olio degli strati superiori perfettamente limpido e non agitato restava ben presto completamente sterile; dimodochè se volevo dimostrare nei varii campioni di olio la presenza dei germi patogeni rispettivamente introdottivi, dovevo agitare fortemente il recipiente prima di prelevare l'olio per la semina e preferibilmente andare a prenderlo al fondo del matraccino stesso.

Non ho creduto necessario saggiare la virulenza (e le eventuali sue modificazioni) dei diversi patogeni conservati nell'olio, perchè tale ricerca non ha una grande importanza dal lato pratico della questione: ciò che a noi specialmente interessa è la constatazione dei germi patogeni nell'olio e la lunghezza del periodo di tempo per cui questa constatazione può esser fatta.

Ed ora, ecco in breve i risultati ottenuti e i metodi di cui mi sono servito per l'isolamento dei diversi patogeni studiati.

1. *Stafilococco aureo.* — Per questo, come per lo Streptococco, il B. piocianeo e il Carbonchio, mi sono servito per l'isolamento del solito metodo delle culture a piatto in gelatina.

La cultura eseguita dopo 15 giorni di soggiorno nell'olio, seminando una goccia di questo, ha mostrato ancora sviluppo di innumerevoli colonie tipiche.

Dopo 30 giorni, con una goccia, ottengo un fortissimo sviluppo di colonie: esse mostrano però ritardato in alto grado il potere fluidificante e sono perfettamente incolore, trasformate nella varietà bianca.

Questo fatto, del resto, l'avevo già osservato a proposito dello Stafilococco aureo ritrovato nell'olio di recente estratto: infatti, mentre nel primo mese ne trovavo diverse colonie tipiche, passato tale tempo non trovai più che lo stafilococco bianco, il quale del resto avevo già trovato fin dal principio in unione all'aureo; per la qual ragione lo inclusi nell'elenco dei germi riscontrati, come un'entità a sè.

Dopo 45 giorni si sviluppano più poche colonie lentamente fluidificanti e bianche.

Dopo 50 giorni, qualche rara colonia ancora.

Dopo due mesi dall'avvenuto inquinamento, non riesco più ad ottenere nessuna colonia.

2. *Steptococco piogene.* — Dopo 15 giorni dall'inquinamento, si ha sviluppo abbondantissimo di colonie da una goccia di olio del fondo.

Dopo 30 giorni, sviluppo moderato di colonie.

Dopo 45 giorni, pochissime oolonie.

Dopo 50 giorni, appena qualche rara colonia.

Dopo passati 58 giorni, non si isola più assolutamente.

3. *Bacillo piocianeo.* — Dopo 15 giorni, si ha completa fluidificazione da piocianeo della gelatina, tanto nella prima quanto nella seconda diluizione.

Dopo 25 giorni, nella prima diluizione ancora fluidificazione entro due giorni e mezzo; nella seconda diluizione invece si ottengono colonie numerose, ma già di molto diminuite in paragone di prima.

Dopo 30 giorni è molto diminuita la pigmentazione verde.

Dopo 40 giorni si sviluppano poche colonie tanto nella prima che nella seconda diluizione; in quest'ultima con un ritardo di due giorni sulla prima, ossia quattro giorni dopo eseguita la cultura; tutte le colonie mostrano scarsa pigmentazione verdognola.

Dopo 45 giorni, si può ottenere ancora, non sempre però, qualche rara colonia.

Dopo 52 giorni, non si ottiene più sviluppo alcuno.

4. *Bacterium coli.* — In diverse prove fatte col solito metodo delle culture a piatto in gelatina, seminando direttamente l'olio inquinato, non mi è mai riuscito di isolare il *B. coli,* sopraffatto da tutti gli altri germi presenti, specialmente dalle muffe. Ho dovuto perciò ricorrere prima ad un liquido di arricchimento, che mi permettesse poi di isolarlo; epperò mi sono servito del metodo al brodo lattosato concentrato dell'Abba, che mi si è dimostrato ottimo e di sicuro effetto (1).

A quest'uopo aggiungevo a circa 90 cmc. di acqua comune sterilizzata in un matraccino di Erlenmeyer 10 cmc. di brodo lattosato concentrato, alcalinizzando il liquido secondo la prescrizione dell'autore. Così preparato il liquido di arricchimento, vi seminavo qualche goccia dell'olio in esame agitato e preso dal fondo. Portavo in termostato a 37°, attendendo la decolorazione del brodo. Decoloratosi questo e intorbidato, ne prendevo alla superficie con l'ansa di platino una gocciolina, con cui praticavo l'isolamento su vari tubi di agar inclinato, seguendo la tecnica dell'Abba. Facevo inoltre direttamente dal brodo decolorato e intorbidato delle culture a piatto in gelatina, ottenendo senz'altro di isolare il *B. coli* in minor tempo e in maniera altrettanto sicura che cogli strisciamenti sui tubi di agar.

Servendomi dunque del metodo dell'Abba, ho potuto constatare la presenza del *B. coli* nell'olio inquinato fino a 40-45 giorni dall'avvenuto inquinamento.

Certamente che con questo processo non ci si può valere del criterio di progressiva diminuzione del numero delle colonie fino a totale estinzione,

---

(1) Lo ritengo il miglior metodo stato proposto per l'isolamento del *B. coli.* — V. la descrizione nell'Abba: *Manuale tecnico di microscopia e batteriologia applicate all'igiene*, 2ª edizione 1902, Clausen, Torino, pag. 459 e seg.

come per gli altri germi; ma bisogna limitarsi a registrare fino a qual termine si riesce ad ottenere lo sviluppo del *B. coli*. L'inconveniente, come si vede, non è grande, poichè quello che a noi importa è di assicurarci se tale germe esiste nell'olio o no; se vi è, poco importa che noi sappiamo se esso vi esista in quantità grande o minima.

5. *Bacillo del tifo.* — Per le stesse ragioni esposte a proposito della ricerca del *B. coli*, ho dovuto ricorrere a un metodo speciale di isolamento del B. tifico dall'olio. Ho utilizzato perciò il brodo lattofenolftaleinico dell'Abba, in cui il B. del tifo si sviluppa rigogliosamente.

Perciò in un matraccino di Erlenmeyer contenente 100 cmc. del suddetto brodo seminavo qualche goccia di olio del fondo e lo passavo in termostato a 37°; avvenuto l'intorbidamento del brodo, ne pescavo una piccola goccia e procedevo in tutto come per il *B. coli*.

Anche il b. del tifo, come il *B. coli*, ho potuto isolarlo dall'olio per lo spazio di 40 a 45 giorni dall'avvenuto inquinamento.

Passati i 50 giorni, non mi è riuscito più mai di ottenerlo se non da grossi grumi di cultura, specialmente se inglobati dalle muffe.

Debbo però far notare che, mentre nei primi 15-20 giorni molte delle colonie sviluppatesi in gelatina mostravano ancora la loro forma tipica, negli isolamenti successivi si mostravano sempre atipiche nella totalità, alcune poche soltanto conservando un aspetto che ricordava quello delle tipiche colonie di tifo superficiali.

6. *Vibrione del cholera.* — Anche per il vibrione colerigeno il metodo comune delle lastre di gelatina, seminate direttamente con l'olio, non mi diede alcun risultato. Perciò mi sono servito del metodo di arricchimento secondo Dunham-Koch, seminando alcune goccie di olio in 100 cmc. di acqua comune, addizionata con 1 gm. di peptone secco Witte e 1 gm. di sale di cucina e sterilizzata, portandola in matraccino di Erlenmeyer a largo fondo alla temperatura di 37°.

Appena formatasi una pellicola alla superficie del liquido, ne pescavo un po' coll'ansa di platino, portandola in diversi tubi dello stesso brodo Dunham-Koch alcalino, da cui, sviluppatasi anche qui un'esile pellicola in superficie, facevo l'isolamento con culture a piatto in gelatina alcalina.

Procedendo nel modo descritto, ho potuto isolare il vibrione colerigeno dall'olio ancora dopo 15 giorni dall'avvenuto inquinamento; colture ripetutamente eseguite dopo 16, 18 e 20 giorni non mi hanno più permesso affatto di ritrovarlo.

2. *Carbonchio sporigeno.* — Non occorre dire che, trattandosi di un microrganismo sporigeno, io non aveva la pretesa di vedere la distruzione o nemmeno la diminuzione di resistenza e di virulenza di esso in seguito al soggiorno, sia pure prolungato, nell'olio. Tanto più che già il Baldassarri aveva potuto osservare la nessuna azione su di esso esercitata dall'olio, neppure dopo un anno di soggiorno.

Come mi attendevo adunque, ho potuto facilmente isolare dall'olio inquinato il carbonchio anche dopo sei mesi (chè tanti ne sono passati dalla data dell'inquinamento a oggi che scrivo) non solo, ma avendo iniettato nel cavo peritoneale d'una cavia di gm. 500 2 cmc. dell'olio in questione, questa mi è morta di carbonchio dopo 4 giorni; mentre che un'ansa di cultura in agar (quella stessa che mi servì per inquinare l'olio) mi uccideva, per innesto

sottocutaneo, la cavia in tre giorni. Non si può dunque parlare di diminuzione di virulenza, tanto più se si tien conto del fatto che la cultura, di cui mi servii, non era gran che ricca di spore. Fatto questo che spiega pure perchè le culture eseguite con l'olio inquinato mi hanno dato tutte poche colonie di carbonchio.

8. *Bacillo pseudotubercolare.* — Per la ricerca e l'isolamento di esso dall'olio mi sono servito di culture a piatto d'agar glicerinato.

Preparate delle scatole di agar glicerinato, le passavo dopo solidificazione per parecchie ore a 37°, perchè potesse evaporare l'acqua di condensazione e l'agar farsi alquanto più asciutto; quindi con l'ansa di platino intrisa di olio agitato e ben mescolato col deposito del fondo del matraccio facevo numerosi strisciamenti sulla superficie dell'agar senza scalfirlo. Ciò fatto, passavo le scatole del Petri a 37°. In questo mezzo e a tale temperatura, il *Mycobacterium*, come si sa, si sviluppa rapidamente; e infatti, in meno di 48 ore ottenevo sviluppo rigoglioso.

Un'osservazione che forse merita di essere riferita è questa, che fino dal primo isolamento eseguito dopo 21 giorno dall'inquinamento, insieme alla forma secca rugosa del M. adoperato (varietà β *perrugosum*), ho ottenuto numerosissime colonie della forma umida bianca splendente porcellanacea (varietà α *planum*).

Nell'isolamento eseguito dopo 33 giorni, in seconda giornata, ho ottenuto addirittura la forma umida piana esclusivamente, mentre la forma secca rugosa cominciò a svilupparsi soltanto in quarta giornata, sia indipendentemente dalla forma piana, sia per una trasformazione di piccole colonie di questa forma nella rugosa.

Culture eseguite dopo 40 giorni diedero già scarso sviluppo di piccole colonie che crescevano assai poco e con vita stentata.

Dopo 45 giorni non potei più isolare il micobatterio.

Anche qui, poi, nei grossi grumi di cultura non stati stemperati nell'olio e, subito dopo caduti al fondo del recipiente, stati inglobati dalle muffe, il microrganismo si conserva vivente per un tempo molto più lungo; così, per esempio, ho potuto isolarlo in tal modo anche dopo 70 giorni, sotto forma però di piccolissime colonie puntiformi grigiastre.

Il quadro seguente rappresenta graficamente le esperienze eseguite e i dati da esse ottenuti:

Durata dei microrganismi patogeni nell'olio di oliva.

MICRORGANISMI	Culture eseguite dopo giorni: 15	20	25	30	40	45	50	60	180
Stafilococco aureo. . .	+ +	+ +	+ +	+ +	..	+	+ !	—	..
Streptococco piogene .	+ +	+ +	..	+	..	+	+ !	—	..
Bacillo piocianeo . . .	+ +	..	+ +	+ +	+	+ !	—	..	..
Bact. coli	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ + !	—	..	..
B. del tifo	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ + !	—	..	..
Vibrione del colera . .	+ + !	—	..	..	..	..	..	..	..
B. del carbonchio spor.	..	..	..	..	..	..	..	..	+
B. pseudotubercolare .	..	+ +	..	+ +	+ !	—	..	..	..

Riassumendo i risultati ottenuti, si può conchiudere:

1° *i microrganismi patogeni non sporigeni seminati nell'olio, vi si possono ritrovare ancora viventi e capaci di sviluppo dopo circa 40-45 giorni, taluno anche (cocchi) dopo 50 giorni; eccezion fatta pel solo vibrione colerigeno che vi ha vita brevissima;*

2° *dopo circa la metà di questo periodo di tempo, si può osservare in generale per tutti i germi studiati qualche modificazione nei caratteri culturali o biologici;*

3° *che lo stesso abbia a succedere per i germi patogeni naturalmente pervenuti nell'olio, ne abbiamo una parziale conferma nel comportamento mostrato dallo stafilococco aureo e bianco nell'olio di recente estrazione;*

4° *non è escluso*, e ciò in base ai risultati dell'esperienza, *che gli stessi microrganismi, se siano pervenuti nell'olio in certe speciali condizioni, come ad esempio agglomerati e racchiusi in una specie di involucro protettivo* (frammenti di sputi, pseudo-membrane, coaguli di muco, muco-pus, ecc.), *possano conservare vita e virulenza per un tempo assai più lungo;*

5° *il carbonchio sporigeno* (e com'esso, senza alcun dubbio, gli altri patogeni sporigeni) *ci può soggiornare lunghi mesi senza perdere per nulla delle sue proprietà morfologiche e biologiche e della sua virulenza.*

Corollari pratici.

Nell'olio adunque, riassumendo, pervengono moltissimi germi e vi si conservano per un certo tempo, in dipendenza da varie condizioni di ambiente e dalla diversa resistenza propria dei vari microrganismi; non è escluso vi possano pervenire dei patogeni.

Sarebbe perciò utile il poter impedire, o almeno diminuire il più possibile, questo inquinamento, non soltanto per quello che riguarda i microrganismi patogeni e gli eventuali pericolosi effetti loro, ma anche riguardo ai semplici saprofiti, non pochi dei quali esercitano un'azione dannosissima all'olio, provocandone con le fermentazioni cui dànno luogo, la scomposizione, l'alterazione e conseguentemente il deprezzamento.

Premessa dunque la necessità, non fosse che dal lato industriale, di ottenere l'olio il più possibile privo di germi e tale conservarlo, bisogna tosto osservare non essere possibile una sterilizzazione, come la consigliano il Binaghi e il Baldassarri, per mezzo del calore, sotto pena di alterare l'olio e renderlo affatto improprio al consumo alimentare; mentre d'altra parte, una vera e propria sterilizzazione a freddo con la filtrazione amicrobica non si potrebbe seriamente proporre; restano adunque a prendersi parecchie misure che, tutte insieme, possono fino a un certo grado, più che sufficiente nella pratica, bastare a farci raggiungere lo scopo.

Nella fabbricazione dell'olio adunque si dovrebbero osservare queste regole:

1° eseguire il lavaggio delle olive, *per lo meno* di quelle raccattate di terra, e servirsi all'uopo di acqua pura;

2° dovendo conservare le olive prima di infrangerle, tenerle in ambienti bene spazzati e puliti, aereati ed illuminati, al riparo da insudiciamenti di qualsiasi genere; e se si usasse il sistema della conservazione in vasche (come si pratica sulla riviera del lago di Iseo), adoperare acqua buona e pura;

3° praticare il lavaggio con soluzione bollente di carbonato sodico, al 5 per cento almeno, di tutti gli utensili dell'oleificio; successivamente asportare la liscivia di soda con buona acqua bollita;

4° mantenere, per quanto più sia possibile, una buona pulizia del locale del frantoio, che deve essere sufficientemente ampio, ben

aereato e illuminato, a pavimento ben lastricato; evitare in esso specialmente la sollevazione di polvere;

5° fare uso di acqua di buona qualità e sempre bollita per la estrazione dell'olio;

6° dove si adoperino come forza motrice gli animali, far lavorare questi in un locale apposito separato dal frantoio, alle cui macine il movimento venga comunicato per mezzo di un albero di trasmissione orizzontale, attraverso il muro divisorio dei due locali;

7° mantenere le conche di chiarificazione in un adatto locale appartato, riparato dalla polvere, e ben chiuse; il locale sia pulito, ben arieggiato ed esposto a mezzogiorno o, occorrendo, riscaldato, onde facilitare la sedimentazione delle materie estranee dell'olio, e insieme con esse dei germi presenti;

8° escludere dalla lavorazione gli individui affetti da malattie infettive;

9° attendere, prima di dare l'olio al consumo, almeno due o tre mesi, tempo sufficiente per la distruzione di parte dei microrganismi presenti, in particolare dei comuni patogeni e saprofiti non sporigeni; e sufficiente pure per la eliminazione di una grandissima porzione dei germi contenuti nell'olio per mezzo della sedimentazione e dei ripetuti travasamenti;

10° meglio ancora della misura di cui sopra, generalizzare la pratica della filtrazione o della chiarificazione cogli acidi vegetali.

E per la buona conservazione dell'olio, sempre dal lato igienico nonchè industriale, si raccomanda ancora:

11° che gli orci vengano prima dell'uso ben puliti con soluzione bollente di soda, risciacquati con buona acqua bollita, e che nel fondo contengano uno strato di qualche cm. di altezza di buono aceto o di soluzione concentrata di un qualche acido vegetale (citrico o tartarico), entro cui vada a raccogliersi tutto ciò che deposita l'olio soprastante;

12° che tali recipienti, ben chiusi, siano tenuti in un locale adatto, pulito, ben lastricato, esente da polvere, a pareti e vôlte bene intonacate, a temperatura poco variabile, al difuori della possibilità di inquinamenti; e che perciò pure si adoperino per il prelevamento dell'olio utensili sempre di scrupolosa nettezza;

13° che si eviti il maneggiamento dell'olio per parte di individui affetti da malattie infettive;

14° che si pratichi, con tutte le accennate cautele, il travasa-

mento dell'olio almeno due volte nell'anno, specialmente all'avvicinarsi della stagione calda.

Mi si potrebbe obiettare ch'io troppo esigo. Non credo: e in appoggio alla mia tesi dirò che l'osservanza di tutte queste misure, se ad altro non giovasse, farebbe realizzare a produttori e industriali un forte guadagno, per la migliorata qualità dell'olio così ottenuto e per l'eliminato pericolo di alterazioni di origine batterica. Queste misure adunque si possono chiedere nel nome dell'igiene e nell'interesse dell'industria insieme.

Agosto, 1902.

BIBLIOGRAFIA.

1. *Azione dei grassi animali e vegetali sui microrganismi patogeni.* Riforma medica, anno XV, vol. IV, 1899, pag. 351.

2. *Sul contenuto microbico e sulla resistenza dei germi patogeni in alcuni olii.* Giornale della R. Società Italiana d'igiene di Milano, anno XXIII, 1901, pag. 66.

LABORATORIO BATTERIOLOGICO E MEDICO-MICROGRAFICO DELLA SANITÀ

Della resistenza e dell'adattamento del B. pestigeno

a vivere nell'acqua potabile.

Ricerche del dott. **F. INGHILLERI**, medico provinciale.

Può il bacillo della peste vivere e moltiplicarsi nell'acqua? è questo il problema che io ho studiato in questa prima memoria rispetto all'acqua potabile.

L'interesse che offre la conoscenza del modo di comportarsi della resistenza degli schizomiceti patogeni nell'ambiente in cui vive l'uomo, spiega la ragione di essere delle numerose osservazioni epidemiologiche e delle ricerche sperimentali che si raccolgono attorno a questo speciale punto della storia naturale dei germi patogeni; sapere come essi abbandonano l'organismo infetto e pervengono nel mezzo in cui viviamo, conoscere i meccanismi naturali che si oppongono o favoriscono le manifestazioni delle loro attività, quali vie essi tengono per aggredire l'uomo sano, è di tale interesse che ogni studio, ogni paziente ricerca trova la sua ragione di essere e la sua giustificazione. Le recenti epidemie molto hanno insegnato riguardo alla epidemiologia della peste, e le osservazioni e le ipotesi, anche quelle che da principio parvero le più ardite, hanno trovato nell'esperimento la loro conferma. Però non è da ritenere che i rapporti epidemiologici in natura siano solo quelli che stabilisce la nozione teoretica nel suo esclusivismo. Certo, ogni infezione ha un meccanismo epidemiologico speciale, che rappresenta la funzione delle proprietà bio-chimiche dell'agente patogeno nell'ambiente in cui perviene; ma accanto ad esso ne esistono altri numerosi a secondo la resistenza del germe verso gli agenti naturali, e che dànno la spiegazione delle atipie di alcuni episodi epidemiologici.

Dagli epidemiologisti generalmente si nega qualsiasi importanza all'acqua come mezzo di diffusione dell'agente pestigeno, ed a questa opinione sono arrivati basandosi su un triplice ordine di fatti: l'osservazione epidemiologica, l'interpretazione delle forme cliniche rispetto alle vie d'infezione, i risultati sperimentali riguardanti la resistenza del bacillo della peste a vivere nell'acqua. Accade per la peste, ciò che è accaduto per la epidemiologia di altre infezioni, così per il tifo, ed il colera, che per l'esclusivismo teoretico si perdeva ogni obbiettività nello studio e nell'interpretazione dei casi atipici, che ognuno secondo le proprie vedute cercava di contenere negli angusti limiti del dibattuto campo della Trink e della Grund-Wassertheorie. La scoperta della funzione preponderante che nella epidemiologia della peste esercitano alcuni parassiti domestici ha fatto sorgere una nozione teoretica semplice e brillante, ma che può appagare solo una critica superficiale. Difatti, come giustamente osserva Hafkin nel suo lavoro: *La propagation de la peste*, questa funzione non è sufficiente a spiegare la pertinacia delle epidemie di peste, i lunghi periodi di tregua, il ridestarsi di esse negli stessi luoghi, senza ammettere l'esistenza di qualche altro agente ospite del germe patogeno, il terreno o l'acqua. Inoltre il Wilm in base ad accurate e ripetute osservazioni cliniche sostiene che il tubo digerente rappresenta una delle vie più comuni di penetrazione del bacillo pestigeno, e quest'autore porta in appoggio della sua opinione l'avere isolato il germe specifico dall'acqua di un pozzo in una località ove infieriva la peste, e l'avere arrestata l'epidemia inibendo l'uso di detta acqua. Dunque, non manca nè l'osservazione diretta, nè quella clinica, almeno per non far rigettare con disdegno l'ipotesi che l'acqua possa eventualmente rappresentare una via di diffusione dell'agente pestigeno. Restano i risultati sperimentali diretti a studiare la resistenza del bacillo pestigeno nell'acqua. Non era indifferente conoscere la sorte che subiscono nell'acqua i bacilli della peste che vi arrivano sia col lavaggio o per vie più o meno oscure partendo dalle deiezioni del malato o dai cadaveri dei pestosi; però la scarsa importanza data all'acqua nel meccanismo epidemiologico della peste ha fatto sì che solo poche ricerche si posseggono e non tali da poter dire che il problema della resistenza del bacillo pestigeno verso questo agente naturale possa dirsi veramente risolto. Alcuni studiosi, come pure le varie Commissioni incaricate dello studio della peste, hanno trattato la cosa solo incidentalmente, senza riportare alcun dato riguardante i caratteri fisico-chimici e batteriologici dell'acqua adoperata; i risultati però nel loro complesso concordano

nell'assegnare al bacillo della peste una scarsa resistenza, e perciò il nessun pericolo che l'acqua possa eventualmente rappresentare un mezzo di diffusione di questo agente patogeno.

Difatti, secondo la Commissione tedesca esso non vivrebbe che solo 10 giorni nell'acqua sterilizzata e 5 in quella non sterilizzata. Drozdwscky vide che rimanevano virulenti nell'acqua di fiume 7 giorni e 15 in quella di sorgente; Wernike non potè più dimostrare la resistenza all'8° giorno e Abel finalmente al 10° nell'acqua di conduttura sterilizzata.

Qualora si consideri il problema solo dal punto di vista epidemiologico la questione in parte sarebbe risolta; poichè se le ricerche citate dimostrano che il bacillo della peste non si moltiplica, dall'altro dimostrano pure che nel tempo in cui vive vi conserva la sua virulenza e perciò la capacità d'infettare. Ma il problema non ha solo un'importanza epidemiologica, ma anche una biologica, che rientra in quello della resistenza e dell'adattamento del germe pestigeno verso gli agenti naturali, che in opposizione ai risultati sperimentali l'osservazione epidemiologica dimostra grande. Questo contrasto tra dato sperimentale ed osservazione del fatto naturale ubbidisce ad un vizio filosofico del metodo sperimentale, per cui si tende a generalizzare il risultato avuto, riportando alla specie ciò che spesso è proprio dell'individuo o della varietà, accettando come assoluto ciò che solo è contingente. Così si parla di resistenza di un dato germe verso la luce, il calore, la putrefazione senza tener conto che coll'esperimento noi abbiamo creato dei casi che non solo nel loro semplicismo e nel loro artifizio si allontanano dai meccanismi naturali, che tentiamo di riprodurre e studiare, ma che non possono esprimere altro nel loro valore contingente se non che la resistenza di quel dato germe verso quel dato agente naturale in quelle specialissime condizioni di fatto. Ma molto più difficile diventa la soluzione del problema riguardo al suolo e all'acqua per i fattori complessi che vi partecipano, diversissimi tra di loro; sicchè, come giustamente osserva Duclaux in una delle sue mirabili riviste sintetiche: noi non possiamo parlare di una resistenza di un dato germe nell'acqua, ma solo di resistenza di una data varietà di questo germe verso una determinata acqua, in quanto i risultati ottenuti esprimono solo la reazione di quel germe verso i fattori fisico-chimici e microbiologici di quell'acqua, fattori che variano da un'acqua all'altra, proprietà bio-chimiche che diversificano quantitativamente nei germi a seconda l'età e la provenienza..., ecc.

Certo che se la resistenza di un dato germe a vivere ed a mol-

tiplicarsi nell'acqua potesse esser data dall'esperimento nel suo semplicismo, nulla di più facile che ricercarla secondo gli ordinari metodi di tecnica; ma quale analogia l'esperimento così condotto presenta col fatto naturale, e quale valore noi possiamo e dobbiamo assegnare al risultato? Un valore esclusivamente indiziario, che deve servire solo come punto di partenza all'induzione; poichè nel metodo sperimentale non deve mai esser dimenticato l'insegnamento di Galilei: che l'esperimento non è fine a sè stesso ma punto di partenza dell'induzione; ed è a questa massima che io mi sono attenuto nell'interpretare il giusto valore dei risultati ottenuti.

Resistenza del B. pestigeno a vivere nell'acqua distillata e sterilizzata.

Prima di procedere alle ricerche dirette a studiare la resistenza e l'adattamento del B. pestigeno a vivere nell'acqua potabile io volli vedere il suo modo di comportarsi nell'acqua distillata sterilizzata; poichè, sebbene così la questione si allontani dal terreno pratico, in cui solo veramente ha valore, pure qualche lume ne poteva venire al significato delle successive ricerche.

I vari sperimentatori che hanno studiata la resistenza degli Schizomiceti patogeni nell'acqua distillata concordano nella conclusione generica che essa sia meno favorevole alla conservazione dei microbi che le comuni acque potabili. A questo riguardo nessun dato si possiede per il B. pestigeno, in quanto per esso si è ricercata tale resistenza o nelle acque potabili, o in quelle sterilizzate mercè il calore o la filtrazione, con il risultato costante che maggiore essa è nel secondo caso. In queste ricerche, come pure nelle successive, io mi sono servito del B. pestigeno isolato a Napoli dal professor Gosio, adoperando sempre delle culture in agar di 24 ore (T. 35°), di cui conservavo la costanza fisiologica con opportuni passaggi nel topo bianco (*rattus decumanus albus* che veniva ucciso in 18-24 ore) e coltivandolo sempre nello stesso terreno nutritivo e nelle identiche condizioni di temperatura.

Allo scopo di poter meglio determinare la durata massima della vita del B. pestigeno nell'acqua distillata sterilizzata in queste ricerche mi sono attenuto in gran parte ai giusti suggerimenti che danno Strauss e Dubarry nel loro lavoro *La vie des microbes pathoghènes dans l'eau*, però vi ho portato tutte quelle modificazioni che man mano mi erano consigliate dalle peculiarità dell'esperimento o dal fine che mi proponevo, praticando inoltre delle culture di controllo in gelatina ed in agar e delle inoculazioni nel topo bianco. Poichè, se il metodo Strauss Dubarry, che consiste nel trasformare in terreno di cultura coll'aggiunta di brodo il materiale in esperi-

mento, crea le condizioni più favorevoli per la ricerca della durata massima di vita, in quanto permette ai rari individui ancora non morti ma depravati nel loro bio-chimismo di ridestarsi a nuova attività, d'altro canto nulla ci rivela dei fenomeni biologici che in quel mezzo hanno luogo, moltiplicazione, diminuzione e disparizione del germe, attenuamento della sua patogenicità, depravamento del suo protoplasma..., e dell'andamento che essi tengono, e che solo possono esserci svelati dall'osservazione microscopica, dalle inoculazioni e dal conteggio.

Onde evitare di trasportare col materiale culturale anche del terreno di cultura, e di seminare delle forti quantità di germe, fatti questi che influendo sulla vera azione e sui caratteri dell'acqua distillata sterilizzata possono, siccome giustamente osservano nei loro lavori Hüppe e Meade-Bolton, modificare il risultato e portarci perciò ad un apprezzamento inadeguato del fatto naturale, diluivo il materiale culturale (una piccola ansa di platino) in 100 cmc. di acqua distillata sterilizzata, e, dopo avere ben bene agitato in maniera da determinare una distribuzione uniforme e la maggiore possibile dislocazione degli articoli, ne distribuivo 1/2 cmc. per ognuna in una serie di bottiglie di Erlenmeyer contenenti 200 cmc. di acqua distillata sterilizzata; il conteggio fatto immediatamente mi dava in media circa 350 germi per cmc. Queste bottiglie parte furono tenute per tutta la durata dell'esperimento, in stufa alla temperatura di 35° e parte in un armadio all'oscuro dove la temperatura oscillava tra i 18° e i 20° gradi. Il controllo microscopico, culturale e biologico fu fatto nei primi 15 giorni ogni 24 ore, anzi il primo giorno ogni 6 ore, e poi ogni 5 giorni per tutta la durata dell'esperimento che corse dai primi di ottobre (1901) alla fine del maggio scorso.

Durata massima della vita del b. pestigeno nell'acqua distillata sterilizzata.

Per ottenere questo dato, ricorsi, siccome ho detto, alla tecnica consigliata da Strauss e Dubarry, cioè trasformavo coll'aggiunta di brodo peptonizzato il materiale di ricerca in terreno nutritivo, che portavo poi alla stufa a 35° in osservazione per parecchi giorni; contemporaneamente prelevavo di questo materiale, dopo aver bene bene agitato, 2 cmc., che inoculavo nel sottocutaneo addominale di un topo bianco.

Ecco i risultati ottenuti: il b. pestigeno nell'acqua distillata sterilizzata alla temperatura di 35° può vivere da 60 a 75 giorni, conservando il potere vegetativo e la sua virulenza, le quali si modificano solo di grado, come lo dimostrava il graduale ritardo con cui si sviluppavano le colture e morivano i topi in esperimento a mano a mano che la ricerca si allontanava dal momento iniziale; alla temperatura tra 18° e 20° la durata massima di vita oscillava tra i 30 e 60 giorni; le modificazioni quantitative del potere patogenetico e dell'attività vegetativa tenevano lo stesso andamento che nelle ricerche fatte alla temperatura di 35°.

Ricerche microscopiche.

Contemporaneamente alle ricerche culturali ne praticai delle microscopiche con preparati a goccia pendente, a fresco e colorati (bleu di metilene, violetto di Genziana, fucsina di Ziehl), onde studiare le modificazioni di struttura e di forma, e le depravazioni cromatiche che subivano quelle cellule per opera dell'acqua distillata sterilizzata. Nei preparati a fresco fatti nelle prime 24 ore, come pure nei preparati colorati, il bacillo si mostrava normale nei suoi caratteri morfologici, isolato o per lo più riunito in filamenti di più articoli; il protoplasma assumeva bene i colori basici di anilina e lasciava osservare il fenomeno della colorazione polare. Ma dopo 24 ore era già dato osservare delle importanti modificazioni di forma e di struttura sia nei preparati a fresco ed a goccia pendente e meglio ancora nei preparati colorati: i filamenti si facevano sempre più scarsi e il germe mostrava la tendenza a presentarsi in articoli separati; molte cellule poi di quelle isolate o riunite in filamenti non presentavano più un aspetto normale, i contorni meno netti, in alcuni punti grandeggianti, in corrispondenza poi degli spazi interarticolari si avevano veri e propri rigonfiamenti; il protoplasma di molte cellule mostrava una minore affinità per i colori basici di anilina. Queste alterazioni si accentuavano e si facevano più evidenti col prolungarsi dell'azione dell'acqua distillata sterilizzata: i filamenti sempre più scarsi e costituiti al massimo di 2 o 3 articoli, numerose le cellule rigonfie, tondeggianti, fusiformi, lenticolari, con protoplasma vacuolizzato, il quale assumeva difficilmente i colori basici di anilina e la fucsina di Ziehl.

Però tra questi elementi che presentavano un evidente depravamento del protoplasma cellulare, alcuni ve ne erano da prima più numerosi e mano mano scarseggianti fino a scomparire del tutto negli ultimi tempi (in cui la osservazione microscopica rilevava soltanto la presenza di corpi amorfi, granulosi e di detriti di cellule non facilmente colorabili) e che pur mostrando un'ipertrofia del protoplasma e la scomparsa dello spazio equatoriale ipocromatico, presentavano contorni netti ed una grande affinità per i colori basici di anilina; essi spiccavano nel campo microscopico sia isolati, o inclusi nei filamenti accanto ad articoli alterati, per la vivacità di colorazione.

Culture di controllo in terreni solidi.

Per studiare la moltiplicazione o la diminuzione e disparizione del germe ricorsi alle culture in terreni solidi, scegliendo l'agar glicerinato, come il mezzo nutritivo che bene si presta alla vita e alla rappresentazione di alcuni caratteri morfologici culturali del b. pestigeno.

La quantità di materiale che impiegavo in queste ricerche era di 1 cmc. che prelevavo, dopo avere ben bene agitato, con una pipetta di Pasteur e che distribuivo in 5 o più capsule di Petri; queste capsule poi tenevo alla stufa a 35° per tutta la durata dell'osservazione non minore di 8 giorni.

Ecco i risultati per il materiale d'esperimento tenuto alla temperatura di 35°: un centimetro cubico che all'inizio conteneva circa 350 germi, già dopo 12 ore non ne mostrava che 220, dopo 24 ore il numero saliva a 280 per ridiscendere il 2° giorno a 100, a circa 80 il 3° giorno, a 60 il 4° e il 5°, a 30 il 7°; a questa cifra si manteneva costante fin verso la trentesima giornata, in cui il numero ricominciava a ridiscendere, sì che tra il 30° e il 50° giorno non era dato osservare che qualche rara colonia tardiva; in seguito, anche prolungando il periodo di osservazione, le culture restavano completamente sterili. Per il materiale poi tenuto alla temperatura di 18-20 gradi questi fatti tenevano un andamento molto simile, solo si aveva una più rapida discesa delle cifre ed un più rapido scomparire delle colonie, di modo che in 35ª giornata già le culture si mostravano sterili.

Le colonie che nei primi giorni presentavano un aspetto normale, mano a mano lasciavano osservare delle importanti modificazioni morfologiche; si sviluppavano più piatte, più grigiastre, meno trasparenti, perdevano la iridescenza dei margini, il loro potere vegetativo si rendeva sempre minore, e verso gli ultimi giorni non si avevano che delle colonie scarse, per nulla caratteristiche e rassomiglianti ad alcuni tipi di colonie del *Proteus vulgaris*, sì che, se l'esperimento biologico non avesse ogni volta in questi casi dimostrata la diagnosi di natura, all'aspetto non era dato di parlare più del b. pestigeno.

Questi fatti, cioè la diminuzione progressiva e le modificazioni di forma e di potere vegetativo delle colonie tenevano un andamento parallelo a quelli rilevati dall'osservazione microscopica.

Come si vede l'andamento dei fenomeni vitali del b. pestigeno nell'acqua distillata sterilizzata segue la curva inversa a quella data da Miquel per gli schizomiceti delle flore idriche, e già osservate da Percy-Frankland, Leone, Meade-Bolton, Heraeus e molti altri nelle loro ricerche: la diminuzione è reale, rapida e progressiva, e se qualche dato nella sua apparenza dimostra che una limitata moltiplicazione si avvera, si ha ragione di affermare che tale moltiplicazione è solo apparente e dovuta alla dislocazione degli articoli del micelio. I fatti che ci rilevano l'osservazione microscopica, le colture e i controlli biologici dimostrano un progressivo degradamento del protoplasma della cellula batterica, la quale, capitata in un terreno ostile alla sua esistenza provvede solo alla conservazione della specie, per opera di singoli individui, i più forti, i quali utilizzano quelle minime traccie di materiale nutritizio che non ostante ogni sottile accorgimento noi trasportiamo colla seminagione, e da ciò l'ipertrofia e l'ipercromaticità che mostra il protoplasma di alcune cellule, le ultime a scomparire; ma non dando luogo al fenomeno più alto, più nobile della vita, nella sua integrità fisiologica, cioè alla moltiplicazione. Ciò che avviene nell'acqua distillata sterilizzata è ciò che si osserva in qualsiasi cultura vecchia di un

microbo asporigeno, però i fatti vi decorrono più rapidi e in maniera tumultuaria; delle innumere cellule mano mano per selezione naturale operata dall'esaurimento del materiale nutritizio e dall'azione antisettica dei prodotti del ricambio materiale, non restano che rare cellule, progressivamente sempre più scarseggianti, quelli che rappresentano gli organismi forti, similari nella funzione alle spore degli schizomiceti sporigeni, a cui nel teleologismo biologico è affidata la conservazione della specie, e che nelle culture vecchie non si moltiplicano più, vivono inerti esaurendo a poco a poco ogni vitalità e finiscono col subire la sorte delle altre, se a tempo non vengono trasportate in un mezzo favorevole.

Nel complesso le alterazioni morfologiche e cromatiche da me osservate per il b. pestigeno poco si diversificano da quelle rilevate da Curt-Braen per il b. del carbonchio, per quello del tifo, del colera e per lo stafilococco; però io non posso convenire con questo autore nell'interpretazione che egli dà di alcuni di questi fatti, specialmente quando considera come forme non solo involutive ma come vere e proprie cellule morte, quelle che assumono più intensamente i colori di anilina, e che, siccome ho già detto, a mio modo di vedere rappresentano le forme di resistenza del germe; e difatti sono le ultime a presentare la degradazione cromatica del protoplasma. In complesso se la durata massima del b. pestigeno a vivere nell'acqua distillata sterilizzata è abbastanza rilevante, pure non ci è dato di parlare di possibilità di vita, in quanto manca il fenomeno più alto, la moltiplicazione, e noi non siamo di fronte ad altro che ad un fatto di resistenza, la quale contrariamente alla nozione teoretica, si è mostrata elevata in questo elemento. Del resto, che la moltiplicazione del b. pestigeno, ed in genere di tutti gli schizomiceti patogeni, non sia possibile nell'acqua distillata in queste condizioni di esperimento, si comprende facilmente quando si rifletta che tali germi, in special modo se poco avvezzi alla vita saprofitica, si mostrano molto esigenti e mal si prestano a vivere in un mezzo poverissimo o privo di materiale nutritivo, e che nei rapporti tra saprofitismo e parassitismo e nei processi di adattamento, i fenomeni decorrono per gradi e, nel loro meccanismo fisiologico naturale, vi campeggia sempre quello della generazione e perciò della ereditarietà.

Ma su ciò per ora non insisto in quanto forma oggetto della seconda parte di questo lavoro riguardante l'assuefamento del b. pestigeno a vivere nell'acqua potabile.

Resistenza del b. pestigeno a vivere nell'acqua potabile.

Il problema teorico della resistenza massima del b. pestigeno nell'acqua entra nel campo pratico dello studio delle possibilità epidemiologiche quando viene ricercato rispetto all'acqua potabile. Più sopra io ho riportato i dati sperimentali che si possiedono in riguardo e che nel complesso assegnano a tale fenomeno una durata minima ed effimera. Di essi non mi è possibile fare una esauriente critica ed analisi, poichè mancano quelli importantissimi sulla composizione fisico-chimica e microbiologica delle acque studiate, e quelli della tecnica impiegata sono scarsi e non adeguati allo studio del fenomeno. Il quale non può essere rilevato nella sua integrità ed estensione col metodo delle culture a piatto e delle inoculazioni di scarse quantità di materiale (1 cmc.) in animali sensibili, fatte a varia distanza di tempo, in quanto tale metodo che domanda l'impiego di scarse quantità di materiale e dei terreni solidi non è il più idoneo per lo studio di questo problema, e facilmente può trarre in errore, dando come morto un germe, il quale solo si trova già in scarsissimo numero e depravato nelle sue virtù bio-chimiche, ma che ancora è in vita e domanda solo di essere messo in buone condizioni di resistenza per ridestarsi a nuova attività. Io non voglio in questo studio ricercare delle analogie con altri schizomiceti patogeni; i dati che si posseggono sono controversi e la nozione per lo più generica si basa su apprezzamento inadeguato del significato contingente del risultato sperimentale, sì che si parla ancora di scarsa resistenza del b. tifico e dello spirillo colerigeno a vivere nell'acqua potabile, quando la pertinacia di alcuni focolai epidemici di origine sicuramente idrica dovrebbero convincerci del contrario. I risultati già noti sulla resistenza del b. pestigeno a vivere nell'acqua distillata sterilizzata poco o nulla possono dirci riguardo all'andamento di questo fenomeno nell'acqua potabile, in quanto in questo elemento entrano in azione dei fattori che mancano nell'acqua distillata, sali minerali, sostanze organiche e speciali flore microbiche. la cui importanza funzionale nel meccanismo bio-chimico della resistenza vitale degli schizomiceti patogeni nell'acqua ci è rilevata dai lavori di Raulin, Trenkmann, Meade-Bolton, Kraus e molti altri. È perciò che io credo necessario riportare in riguardo i dati delle acque da me impiegate in queste ricerche, per il giusto apprezzamento dei risultati ottenuti, il cui valore contingente esprime solo la reazione di questi fattori sul b. pestigeno nelle peculiari condizioni di esperimento.

Anche in queste ricerche per studiare la resistenza massima ricorsi al metodo Strauss-Dubarry; però questa volta oltre del brodo peptonizzato aggiungevo all'acqua potabile in esame del Na Cl e della glicerina nelle proporzioni rispettive di 0. 50 e di due grammi per 100, e ciò perchè avevo visto che l'uno e l'altra favoriscono la vita del b. pestigeno. Tali prove furono fatte ogni giorno nei primi 10 giorni e poi alla distanza di 5 giorni l'una dall'altra; contemporaneamente dopo aver ben bene agitato il contenuto della bottiglia di Erlenmeyer onde determinare la maggior possibile distribuzione uniforme del materiale, ne prelevavo due cmc. che inoculavo nel sottocutaneo di un topo bianco. Oltre ciò, nei primi giorni, volendo studiare l'intimo andamento del fenomeno della resistenza, cioè, se si aveva moltiplicazione o diminuzione immediata progressiva del germe, ricorsi pure alle culture a piatto in agar glicerinato; ma presto fui costretto a smettere quest'altro metodo di controllo, perchè, non ostante ogni sottile accorgimento di tecnica e frazionamento del materiale, le piastre si mostravano così stipate di colonie di schizomiceti, ifomiceti e di blastomiceti, che ogni esame riusciva non solo difficile, ma per quanto prolungato, nullo. Il germe adoperato fu lo stesso delle ricerche precedenti, e come in quelle, prima di essere seminato nelle acque, veniva diluito nella quantità di una piccola ansa di platino in 100 cmc. di acqua distillata sterilizzata, e dopo avere diligentemente agitato per determinare una esatta distribuzione e la dislocazione degli articoli dei filamenti, distribuito in bottiglie di Erlenmeyer contenenti 200 cmc. di acqua; queste bottiglie poi erano tenute parte alla stufa a 35° e parte in un armadio chiuso alla temperatura di 18-20 gradi per tutta la durata dell'esperimento. Tra le acque potabili, maggiormente utilizzate a Roma, la mia scelta cadde sulla Marcia, la Felice e la Paola, in quanto presentano delle notevoli differenze dal punto di vista della composizione fisico-chimica e del contenuto microbico. Riporto nella tavola I il risultato dell'esame batteriologico da me fatto al momento della presa, e di quello chimico, per cui mi avvalgo del lavoro del Mauro; ma prima credo opportuno aggiungere che l'osservazione prolungata di queste acque, lasciate in riposo, mi permette affermare che il fenomeno della moltiplicazione e della diminuzione dei germi delle loro flore idriche segue l'andamento della curva di Miquel, e che mentre da principio hanno il sopravvento le specie non fondenti, in un secondo tempo sono le fondenti che si mostrano più numerose; e che le colonie di ifomiceti da prima scarse finiscono all'ultimo col prevalere; questo andamento si mostrava più rapido e più intenso nell'acqua Marcia, che nella Felice e nella Paola.

Siccome ho detto non mi fu possibile praticare il controllo in terreni solidi (agar glicerinato) che nei primi giorni, poi la prova riusciva inutile, perchè il prevalere delle altre specie microbiche rendeva vana, dopo 6 giorni per l'acqua Marcia, 4 per la Felice e 3 per la Paola, ogni ricerca, sebbene io usassi diluire nelle prove successive sempre maggiormente il campione che prelevavo e moltiplicassi il numero delle piastre. Le culture fatte all'inizio dell'esperimento, cioè al momento della seminagione, mi diedero un numero di circa 300 colonie di bacillo pestigeno per cmc. rispetto a 35 della flora microbica propria dell'acqua Marcia, a 120 per la Felice, e a circa 900 per la Paola. Ma già dopo 24 ore sia per i campioni tenuti a 35° che per quelli a 18°-20 (la differenza si mostrò solo quantitativa), il rap-

porto si trovava rovesciato; di fronte a poche colonie di bacillo pestigeno se ne avevano numerosissime delle altre specie, e questi fatti si accentuarono nei giorni successivi, finchè fu possibile l'esame, fino a non riuscire più a rintracciare nè colonie caratteristiche nè sospette del b. pestigeno, per quanto diligente ricerca io facessi. Ma mentre le prove di ricerca nei terreni solidi della presenza del b. pestigeno nell'acqua potabile davano la rapida scomparsa di questo germe in pochi giorni, la vita di esso era dimostrata ancora sia colle inoculazioni nei topi bianchi, come pure collo prove di controllo fatte secondo il metodo Strauss-Dubarry. Difatti aggiungendo al contenuto delle bottiglie Erlenmeyer del brodo peptonizzato, del Na Cl e della glicerina, dopo un soggiorno di 12-18 ore nella stufa a 35°, sia per mezzo delle culture a piatto che delle inoculazioni, era dato dimostrare la persistenza del b. pestigeno fino alla 35ª giornata nell'acqua Marcia, alla 33ª nella Felice e alla 28ª nella Paola, per il materiale tenuto alla temperatura di 35° gradi: ed un po' meno per quello tenuto nell'armadio alla temperatura di 18-20 gradi. Inoltre credo opportuno ricordare che la virulenza del germe progressivamente si attenuava, e abbisognava sempre maggior tempo, fino ad 8 giorni, per avere la morte del topo bianco colla stessa quantità di materiale.

Secondo questi risultati la resistenza del b. pestigeno a vivere nell'acqua potabile è maggiore di quella che altri sperimentatori hanno trovata. Io ho detto più sopra che la deficienza di alcuni dati importantissimi in quelle ricerche non mi permetteva di farne una critica ed un'analisi esaurienti; però la diversità di risultati può essere spiegata dalla differenza tenuta nei metodi di indagine. Poichè quegli autori si sono contentati di dimostrare la resistenza massima della vita del b. pestigeno nell'acqua potabile ricorrendo al sistema delle culture a piatto e delle inoculazioni, preoccupandosi perciò quasi più dei germi che morivano, che di quelli rimasti ancora in vita per quanto depravati; io adottando il metodo Strauss-Dubarry venivo a mettermi in condizioni migliori di esperimento e mi avvicinavo di più alla verità.

In ogni modo siccome per l'acqua distillata sterilizzata, nel fenomeno della resistenza del b. pestigeno nell'acqua potabile, manca il fatto più nobile, più saliente della vita vegetativa, la moltiplicazione: il b. pestigeno nelle condizioni di esperimento non trova nell'acqua potabile un ambiente favorevole alla sua esistenza, e da qui il rapido scomparire di esso e la progressiva diminuzione del suo potere patogeno.

Ma sono tali fatti in rapporto soltanto dell'azione dei fattori fisico-chimici e microbiologici dell'acqua potabile sul b. pestigeno, o nell'esperimento ne intervengono altri, per cui quest'opera si modifica almeno quantitativamente, sì che la durata massima deve

essere maggiore di quella ottenuta e perciò la possibilità della vita? In altri termini la scomparsa del germe è un prodotto diretto dell'azione di questi fattori, o dell'azione di questi fattori, nelle condizioni di esperimento?

Nello studio della resistenza del b. pestigeno nell'acqua distillata sterilizzata il problema, qualora si usi l'accorgimento di non trasportare colla semente del materiale nutritizio, resta contenuto nei due termini dell'esperimento, il germe e l'acqua, sì che il risultato viene ad esprimere solo il contrasto di questi due agenti; ma per l'acqua potabile entrano in campo nuovi fattori e volendo ricordare i maggiori e più attivi, i sali minerali, le sostanze organiche, le flore microbiche, la temperatura, e da qui una folla di azioni misteriose ostili o favoreggianti che noi solo possiamo apprezzare nel risultato facendoli agire separatamente. E ciò che io feci, però solo per due acque, le quali presentano due tipi diversi, la Paola e la Marcia; studiando prima come si comporta in esse (alle temperature possibilmente vicino alle naturali di dette acque) il b. pestigeno quando vengono private mercè un'accurata filtrazione della flora batterica; secondo, i fenomeni di simbiosi o di anantobiosi che si stabiliscono tra il b. pestigeno e le varietà coltivabili di quelle flore.

Le acque filtrate all'apparecchio Berchefeld riuscirono completamente sterili, e davano un contenuto in sostanze organiche quasi uguale a quelle avanti la filtrazione. Dopo la seminagione ed il prelevamento del campione per il conteggio iniziale e per la prima inoculazione, la boccetta contenente l'acqua Marcia fu messa in un bagno a ricaduta dove scorreva continuamente dell'acqua Marcia; quella dell'acqua Paola in un refrigerante a temperatura costante di 15 gradi. Il controllo veniva praticato sia col sistema delle colture a piatto in agar glicerinato, sia colle inoculazioni nei topi, riportando i dati a quelli ottenuti all' inizio nelle stesse condizioni di esperimento. Le due acque all' inizio contenevano circa 280 b. pestigeni per cmc. ed 1 cmc. di esse uccideva un topo bianco del peso di grammi 110 in circa 24 ore.

Riassumo nella tavola II i risultati del conteggio e delle inoculazioni, fatti per circa 30 giorni, da prima ogni giorno e poi ogni 5 giorni, e che dimostrano come l'andamento della resistenza del b. pestigeno in questi casi segua la curva data dal Miquel per i fenomeni di moltiplicazione e successiva diminuzione dei germi idrici nell'acqua.

L'osservazione microscopica fatta contemporaneamente lasciava osservare nelle prime 36 ore gli stessi fatti rilevati per l'acqua distillata steri-

lizzata nello stesso spazio di tempo, cioè il b. pestigeno si presentava isolato o riunito in filamenti di due o più articoli, alcune cellule si mostravano leggermente deformate, con contorni meno netti e protoplasma meno affine per i colori basici di anilina. In seguito i filamenti si facevano sempre meno numerosi e più brevi, prevalevano le cellule isolate più sottili di quelle ordinarie, che però assumevano bene le sostanze coloranti, ma non presentavano il fenomeno della colorazione polare; verso il 15° giorno, infine, tornavano a farsi numerose le forme involutive. Anche nelle colonie si notavano delle modificazioni morfologiche, in quanto esse perdevano progressivamente l'aspetto caratteristico, si mostravano più piatte, a margini meno frastagliati poco iridescenti, più grigiastre, e anche quando in una piastra erano in poche, sì che non era dato parlare di azione vaccinante reciproca del terreno, si sviluppavano poco e rimanevano per lo più nane.

Nessun dubbio in base a questi risultati che il b. pestigeno vive e si moltiplica in quelle acque prive delle loro flore microbiche, e che perciò la composizione chimico-fisica di esse acque e le basse temperature non ne ostacolano la vita, ma solo imprimono a quella cellula delle modificazioni bio-chimiche (potere patogenetico), culturali, morfologiche; sì che la mancanza del fenomeno della moltiplicazione nell'acqua, non priva della flora microbica, si deve ricercare nella funzione di essa flora o nelle condizioni d'artificio dello esperimento.

Colla seminagione in un'acqua potabile noi portiamo il B. pestigeno in un mezzo di già abitato per delle specie più adatte a vivere in quel mezzo; e perciò nel fenomeno di resistenza possono essere invocate delle questioni confuse di concorrenza vitale dovute sia alla più rapida utilizzazione del materiale nutritizio da parte dei germi della flora idrica, sia all'azione dei prodotti del ricambio materiale, siccome trovò Hankin per le acque del Gange e del Iumna. Ma quest'ultimo fattore per le acque in esperimento, almeno al momento della raccolta, non può essere invocato, poichè, siccome abbiamo visto, il B. pestigeno vive e si moltiplica in esse quando vengono, mercè la filtrazione, private della loro flora microbica; nè noi possiamo spiegare con un fatto di anantobiosi il rapido declinare della vita del B. pestigeno in queste acque, in quanto bastava aggiungere a queste acque, anche dopo molti giorni dalla seminagione, del materiale nutritizio per avere una moltiplicazione del germe in presenza degli altri della flora idrica. Che anche nel corso dell'esperimento entrino in azione i prodotti del ricambio materiale non si può negare, ed io lo potei constatare coltivando il B. pestigeno in acqua Paola filtrata, dopo essere rimasta 30 giorni nella stufa e dopo aver constatato in essa un rigoglioso

sviluppo prima ed un esaurimento poi delle forme microbiche preesistenti. In quest'acqua così filtrata, sebbene l'esame chimico dimostrasse presenza di sostanze organiche in non scarsa quantità, la scomparsa del B. pestigeno avveniva ancora più rapidamente, che in quella non filtrata e raccolta di fresco; inoltre, siccome Hankin, potei osservare che la stessa acqua sterilizzata all'autoclave lasciava vivere e moltiplicarsi il B. pestigeno; sì che a spiegare il fenomeno della minore resistenza nel primo caso, non poteva essere invocata la deficienza del materiale nutritizio, ma l'azione dei prodotti del ricambio materiale, i quali venivano distrutti nel secondo caso delle alte temperature. Questi risultati chiaramente dimostrano per le acque potabili di Roma che l'andamento e la durata della resistenza del B. pestigeno in esse acque non esprime la funzione diretta dei fattori fisico-chimici e microbiologici di queste acque sul B. pestigeno, ma la somma di queste azioni più quelle che si determinano nel corso dell'esperimento e che modificano profondamente questi caratteri e perciò non possiamo eliminare la presunzione logica, che in natura le cose possono procedere diversamente o almeno in modo meno tumultuario; e da qui la possibilità che la resistenza naturale sia maggiore di quella stabilita dall'esperimento e sia possibile in esse acque la vita del germe e la sua moltiplicazione. Poichè qual paragone può esistere tra un'acqua che normalmente contiene 40 germi per cm. cubico, con la stessa la quale ne presenta dopo 2 o 3 giorni 2 o 300 mila? Che mentre prima non aveva alcuna virtù battericida poi ne presenta una anche per molte varietà della propria flora, dovuta all'accumulo dei prodotti del ricambio materiale? Che ha quasi esaurito per la più attiva utilizzazione da parte dei germi propri il materiale nutritizio che al momento della raccolta vi si trovava disciolto? Tra un'acqua infine in cui esiste un equilibrio tra sostanze organiche, numero dei germi, prodotti del ricambio materiale, con la stessa acqua in cui questo equilibrio da un momento all'altro vien rotto per la moltiplicazione rapida dei germi propri, per l'esaurirsi del materiale nutritizio e l'accumularsi dei prodotti di questo ricambio materiale? Sarebbe lo stesso che voler paragonare nelle sue virtù fisiologiche l'acqua potabile scorrente, con la stessa acqua che si ingora in una fossa stagnante.

Dunque non v'ha dubbio che molto diversamente debbano procedere nel fatto naturale i fenomeni di resistenza di uno schizomiceto patogeno, qualora, siccome nelle acque in esperimento, non si possano invocare virtù ostili dei fattori chimico-fisici e microbiolo-

gici dell'acqua potabile. Nel fatto naturale l'azione d'artificio dell'esperimento, che profondamente altera la proprietà dei fattori fisico-chimici e microbiologici dell'acqua, manca: il numero dei germi della flora idrica si mantiene, tranne alcune vicende transitorie, costante; il materiale nutritizio per quanto scarso continuamente rinnovato e rapidamente eliminati i prodotti del ricambio materiale; mancano perciò i fattori principali a cui nell'esperimento è dovuta la rapida scomparsa del B. pestigeno nell'acqua potabile, e perciò si rende possibile la vita e la moltiplicazione di esso.

Altri fattori si possono invocare nel fatto naturale, i quali agiscono avversando la vita del germe; la deficienza del materiale nutritizio, la sua costituzione e configurazione molecolare rispetto alle proprietà diastasiche del germe, la bassa temperatura dell'acqua, il suo movimento rapido. Riguardo al materiale nutritizio e alle questioni di quantità e di qualità di esso e così pure riguardo alla temperatura le ricerche da me fatte in proposito e sopra riportate dimostrano che se il B. pestigeno ha delle esigenze eugesiche in proposito, siccome molti altri germi patogeni facilmente si adatta a vivere nei terreni poveri, ed a bassa temperatura (15°-18°), come l'acqua Paola e Marcia, prive delle loro flore, tranne che non intervengano altri fattori a depravare l'elasticità di adattamento del protoplasma cellulare; riguardo poi al movimento, che le esperienze del De Mattei e Stagnitta hanno dimostrato ostile alla vita dei germi patogèni nell'acqua, esso non è uno stato assoluto dell'acqua potabile, e può mancare nella realtà, se consideriamo l'acqua non nel solo momento in cui scorre nei tubi, ma anche quando si trova nelle cassette di riserva e di distribuzione, nei recipienti, ecc. Ma inoltre noi dobbiamo tener conto dei fatti di adattamento che possono intervenire nel meccanismo del fatto naturale, in cui rapporti tra germe patogeno ed acqua non si stabiliscono così brutalmente siccome nell'esperimento, ma spesso attraverso quelli misteriosi che intercedono tra terreno ed acqua, e mercè cui il germe può acquistare virtù di speciale resistenza. Ciò di cui bisogna tener conto dal punto di vista epidemiologico è che non sempre il meccanismo d'inquinamento consiste nel rapporto diretto immediato del materiale patologico e dell'acqua, anzi io credo che questo sia non solo il meno frequente ma anche il meno pericoloso; poichè, il germe così pervenuto nell'acqua non a lungo può resistere alle nuove e non idonee condizioni di esistenza in cui viene a trovarsi passando bruscamente dalla vita parassitaria eugesica, a quella saprofitica in condizioni sfavorevoli di ambiente; spesso intervengono funzioni

misteriose di filtramento attraverso il terreno e perciò di selezione e di adattamento delle cellule forti, e da qui una maggiore resistenza delle nuove forme verso le nuove condizioni di vita. Ma oltre ciò noi non possiamo, in base ai risultati dell'esperimento negare che nel fatto naturale sia possibile una vera e propria moltiplicazione del bacillo pestigeno; se ciò non avviene nelle condizioni dell'esperimento, siccome si è visto, si deve alla rapidità con cui intervengono i fattori artificiali che ostacolano tale moltiplicazione, cioè esaurimento del materiale nutritizio, accumulo dei prodotti del ricambio organico; e che trasformano il processo di esistenza del bacillo pestigeno nell'acqua in un fenomeno semplice di resistenza e di conservazione, che non arriva a quello di adattamento, perchè manca la moltiplicazione e perciò il trasferimento alle nuove generazioni di nuove proprietà che nella lotta viene ad acquistare il protoplasma cellulare degli organismi forti.

Inoltre anche che si voglia considerare l'acqua come un terreno poco adatto alla vita degli schizomiceti patogeni, noi non possiamo a priori negare che un dato germe patogeno vi si possa adattare a vivere e a moltiplicarsi. A questa affermazione siamo portati non solo dallo studio della storia naturale di questi organismi rispetto ai rapporti ontogenetici e filogenetici nella funzione del principio della conservazione e dell'adattamento, ma anche dal risultato sperimentale. Se ogni germe, siccome ogni organismo, ha delle condizioni eugesiche di esistenza che preferisce, non vuol dire che esso non arrivi ad adattarsi a vivere in ambienti ostili e a sopportare l'azione di sostanze battericide; la letteratura sperimentale è ricca di esempi in proposito, che dimostrano come sia possibile coll'artificio dell'esperimento conferire al protoplasma di queste cellule nuove proprietà. Così il Trenkmann, per citarne qualcuno che fa al caso, basandosi sugli studi fatti dal Raulin vide, che bastava modificare coll'aggiunta di nuove quantità di qualche sale la composizione quantitativa di un'acqua, perchè aumentasse non solo la resistenza dello spirillo colerigeno a vivere in quell'acqua, ma perchè fosse possibile la moltiplicazione di esso; gli studi di Hafkine sugli infusorii e sugli schizomiceti poi sono esaurienti in riguardo. Inoltre Wolfhugel e Riedel nelle loro ricerche sulla moltiplicazione dei microrganismi nell'acqua potabile videro che lo spirillo colerigeno proveniente da una cultura in brodo o in agar portato nell'acqua distillata muore rapidamente e che lo stesso non avviene se il germe proviene da una cultura in acqua. A tali risultati si oppongono quelli di Hochstetter, ma il loro valore ri-

mane lo stesso; poichè Hochstetter nelle sue ricerche ricorse ad una cultura in acqua di 190 giorni, ed un germe, siccome giustamente osserva in proposito Duclaux, può essere vivo ed attivo dopo pochi giorni di vita nell'acqua e fragile dopo 10 mesi. L'adattamento non è nella sua essenza biologica che la trasformazione del potere di conservazione e di lotta per l'esistenza in una nuova facoltà, trasmissibile che il protoplasma cellulare acquista verso un determinato agente naturale o artificiale, esso è perciò l'opera di un'azione graduale lenta e continua che si esercita e si tramanda sulle successive generazioni, e non quella di un'azione tumultuaria e catastrofica. A questo principio hanno ubbidito tutti gli sperimentatori che hanno studiato il potere di adattamento degli schizomiceti, e ad esso mi sono uniformato anch'io nel ricercare tale proprietà per il b. pestigeno verso l'acqua potabile.

Adattamento del b. pestigeno a vivere nell'acqua potabile.

Nella sua essenza fisiologica il fenomeno della scarsa resistenza del b. pestigeno a vivere nell'acqua potabile in confronto delle specie idriche, non esprime altro se non la diversa idoneità a vivere in quelle condizioni di ambiente e ad utilizzare il materiale nutritizio. Per cui induttivamente è dato stabilire che basti creare questa idoneità educando il b. pestigeno a vivere a contatto degli altri germi della flora idrica in quelle determinate condizioni di temperatura e di materiale nutritizio, perchè il fenomeno presenti un andamento simile a quello della vita degli altri microbi, cioè segua la curva di Miquel. È perciò che in queste ricerche cominciai coll'educare il b. pestigeno a vivere con successivi passaggi in terreni progressivamente più poveri di sostanze nutritive alla t. di 15 gradi, fino ad arrivare all'acqua Marcia priva della sua flora microbica, e poi a coltivare il germe, fatto così poco esigente di materiale nutritizio, a vivere in questi terreni poveri a contatto dei germi che ordinariamente si trovano in quell'acqua (per far ciò aggiungevo ai terreni poveri delle quantità sempre maggiori di acqua Marcia naturale).

Questi terreni erano costituiti di acqua Marcia sterilizzata al calore, a cui addizionavo del brodo semplice nel rapporto di cmc. 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; . . . . 0,1; 0,09; . . . . 0,1; 0,009; . . . . 0,001 : 1000. Appena la coltura presentava un leggero intorbidamento, e le colture a piatto mi dimostravano che il germe si era moltiplicato, praticavo il pas-

saggio seminando nel terreno culturale successivo 1 cmc. della cultura precedente. In questi terreni il germe viveva e si moltiplicava, siccome dimostrarono le prove di controllo fatte ogni volta all'inizio, cioè al momento della seminagione e appena manifestatosi l'intorbidamento. La virulenza si conserva attenuandosi progressivamente, così il bacillo che all'inizio uccideva in 24 ore il topo bianco, alla fine richiedeva 7 e più giorni per dare la morte all'animale. All'esame microscopico e culturale il bacillo presenta inoltre delle notevoli differenze, si mostra più sottile, non presenta il fenomeno della colorazione polare, in brodo non tende a formare i caratteristici filamenti, ma l'intorbida uniformemente, e si mostra isolato o riunito in 2 o 3 articoli; le colonie in gelatina ed in agar hanno perduto molto del loro aspetto caratteristico, mostrano una evidente e progressiva attenuazione del potere vegetativo, conservandosi per lo più nane, grigiastre, appiattite a margini ondulati, sì da ravvicinarsi come tipo ad alcune forme di colonie del proteus e dei tifo-simili. Questo germe resiste più a lungo nell'acqua distillata sterilizzata, senza che sia però dato parlare di veri e propri processi di moltiplicazione, ma nell'acqua Marcia, filtrata o sterilizzata col calore, vive e si moltiplica comportandosi come le specie idriche.

È da questa varietà, poichè è il caso di parlare di varietà, di b. pestigeno che son partito negli esperimenti diretti a studiare il modo di comportarsi della sua resistenza vitale nell'acqua Marcia naturale alla temperatura di 15, ed eccone i risultati desunti dalle prove di controllo in terreni solidi (agar glicerinato), terreni liquidi (metodo Strauss-Dubarry) e dalle inoculazioni nei topi bianchi: il b. pestigeno, così ottenuto, vive e si moltiplica nell'acqua Marcia in presenza delle specie idriche che compongono la flora microbica di quest'acqua, anzi nei primi giorni il suo sviluppo sembra prevalere su quello delle altre specie, ed è dato constatarne colle culture a piatto la presenza anche in 20ª giornata, mentre che colla varietà originaria nelle stesse condizioni di esperimento non era dato più in 5ª o 6ª giornata rintracciare alcuna sua colonia; in seguito le forme fondenti e gli ifomiceti alla fine prendono il sopravvento, ma è dato colle inoculazioni e meglio col metodo Strauss-Dubarry svelarne la presenza anche dopo 120 giorni. Il germe isolato conserva questa maggiore resistenza quando viene coltivato nei terreni poveri, ma la perde se viene di nuovo coltivato negli ordinari mezzi nutritivi e passato attraverso il topo bianco.

Questi risultati sono importanti, perchè confermano l'induzione, cioè che non è la deficienza o la natura del materiale nutritizio, la temperatura non eugesica, la presenza di altri germi più proprii all'ambiente, che ostacolano nell'esperimento l'adattamento del bacillo pestigeno a vivere e perciò a moltiplicarsi in una data acqua potabile, quando lo studio di questi fattori non dimostra alcuna virtù speciale antagonistica alla vita di questo schizomiceto patogeno, ma le condizioni stesse dell'esperimento, che nel loro artificio modificano lo stato di equilibrio bio-chimico dell'acqua, sì da non permettere che l'elasticità di adattamento del protoplasma si eserciti e si originino delle nuove cellule dotate di speciale resistenza: ma

che in natura dove questi fattori, tranne il caso di vicende transitorie, si conservano nell'equilibrio iniziale, la vita e la moltiplicazione del germe si rende possibile. E perciò nell'acqua, la cui funzione conservatrice dei microbi è in certa misura analoga a quella del suolo, e in cui i rapporti e le funzioni delle sostanze organiche e minerali, quelli della concorrenza vitale sono sì varii, i germi patogeni comunque pervenuti, possono trovare condizioni che ne permettano la vita e la moltiplicazione, siccome per il bacillo tifogeno e per lo spirillo colerigeno hanno dimostrato molti ricercatori, e per il bacillo della peste Wilm. Ed è perciò vero ciò che scrive Duclaux « que si d'une manière générale, l'eau est un milieu peu favorable aux microbes pathogènes, elle ne l'est pas toujours et qu'il est toujours prudent de traiter comme si elle ne l'était jamais ».

TAVOLA I.

Analisi chimica delle acque potabili della città di Roma Prof. F. Mauro - Roma 1884			
100,000 di acqua contengono grammi di	Felice	Paola	Marcia
Na Cl.	1,649	6,146	0,643
$Na_2\ Co_3$.	2,535	2,961	0,186
$K\ No_3$	1,153	0,436	0,429
$K_2\ Co_3$	3,337	4,223	..
$Ca\ So_4$	3,461	3,552	0,449
$Ca\ CNo_3\ d_2$	..	..	0,074
$Ca\ Co_3$	21,955	4,371	19,270
$Mg\ Co_3$.	5,817	3,898	6,888
$Si\ O_2$.	4,360	1,625	0,680
Somma dei composti organici fissi . .	44,267	27,212	28,619

Analisi batteriologica		
Acqua	Numero dei germi in 1 cmc.	Composizione della Flora microbica
		Proteus vulgaris. B. subtilis.
Marcia	35	*B. fluorescens liquefaciens.*
		B. Fluorescens non liquef. Sarcina lutea Aspergillus niger. Pen. glaucum.
Felice.	120	*Proteus vulgaris. B. fluorescens liquefaciens. B. fluorescens non liquef. B. radiciformis. B. subtilis. Micrococcus candicans e M. prodigiosus. Sarcina alba. S. aurantiaca. Clodotrix dicotoma. Aspergillus niger. Penicillum glaucum. Similtifo.*
Paola.	900	All'esame batteriologico si riscontra un numero di specie maggiori, in cui oltre quelle sopra menzionate, se ne trovano altre che non mi è riuscito classificare. Numerose le varietà del gruppo tifo-simile e coli-simile (però non patogene pel topo bianco).

TAVOLA II.

Marcia — Temperatura 12°-14°			Paola — Temperatura 15°		
Tempo dell'esperimento dopo	Conteggio delle colonie — Numero iniziale 280 per cmc.	Inoculazioni — Risultati — Virulenza iniziale — Il topo bianco muore dopo 24 ore	Tempo dell'esperimento dopo	Conteggio delle colonie — Numero iniziale 280 per cmc.	Inoculazioni — Risultati — Virulenza iniziale — Il topo bianco muore dopo 24 ore
1 giorno.	115	Morto dopo 36 ore.	1 giorno	162	Morto dopo 28 ore.
2 giorni.	100	Id. 43 »	2 giorni	98	Id. 42 »
3 »	140	Id. 38 »	3 »	120	Id. 46 »
4 »	360	Id. 52 »	4 »	290	Id. 39 »
5 »	2300	Id. 70 »	5 »	3000	Id. 60 »
6 »	8000	Id. 4 giorni circa.	6 »	10000	Id. 74 »
7 »	2900	Id. 4 giorni.	7 »	4500	Id. 4 giorni circa.
8 »	1100	Id. 5 giorni circa.	8 »	1000	Id. 4 »
9 »	700	Id. 5 »	9 »	630	Id. 4 »
10 »	400	Id. 5 »	10 »	240	Id. 5 »
15 »	180	Id. 7 giorni.	15 »	100	Id. 7 »
20 »	90	Rimasto vivo.	20 »	75	Id. 7 »
25 »	45	Morto dopo 7 giorni circa.	25 »	36	Rimasto vivo.
30 »	20	Rimasto vivo.	30 »	15	Morto dopo 7 giorni circa.

LETTERATURA.

MUSEHOLD. *Die Pest*, etc. Berlin, 1901.

WILM. *Pestepidemie in Hongkong*. Hyg. Rundschau, 1897, n. 5-6.

PERCY-FRANKLAND. *Eliminazione dei microrganismi nell'acqua*, Proc. Roy. Soc. 1885.

IDEM, *Sulla moltiplicazione dei microrganismi dall'acqua*, Proc. Roy. Soc. 1886.

HERAEUS. *Ueber das Verhalten der Bacterien in Brunnenwasser...* Zeitsch. f. Hyg. T. 1°, 1886.

MEADE BOLTON. *Ueber das Verhalten verschiedener Bacterienarten in Trinkwasser*. Ibidem.

MIQUEL. *Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux*. Paris, 1891.

TRENKMANN. *Contributo alla biologia del komma-bacillo*. Centralbl. f. Bakt., T. XIII, 1893, p. 313.

HAFKINE. *Recherches sur l'adaptation au milieu chez les infusories et les bactéries*. Ann. de l'Institut Pasteur. t. IV, 1890.

HANKIN. *L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du choléra*. Ibidem, t. V, p. 511.

WOLFHUGEL u. RIEDEL. *Die Vermerung der Bacterien im Wasser*. Arb. a d. K. Gesund. 1886.

LEONE. *Ricerche sui microrganismi dell'acqua potabile*. Atti della R. Accademia dei Lincei, serie IV, T. 1°.

KRAUS. *Della maniera di comportarsi dei batteri patogeni nell'acqua potabile*. Arch. f. Hyg., 1887.

STRAUSS et DUBARRY. *Recherches sur la durée de la vie des microbes pathogènes dans l'eau*. Arch. de Med. expérim., 1889.

KARLINSKI. *Ueber das Verhalten einiger pathogener Bacterien in Trinkwasser*. Arch. f. Hyg 1889.

DI MATTEI e STAGNITTA. *Sul modo di comportarsi dei microbi patogeni nell'acqua corrente*. Questi Annali, 1ª serie, 1889.

CURT BRAEM. *Ricerche sui fenomeni di degenerazione dei bacilli patogeni nell'acqua distillata*. Beiträge zur pathol. Anat. v. Ziegler. Bd. XII, libro primo.

DUCLAUX. Traité de microbiologie. Paris, 1898.

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

Sul valore protettivo della cute rispetto ai microrganismi.

Ricerche sperimentali del dott. **G. B. SIMONCINI.**

La superficie cutanea in diretto e continuo rapporto con l'ambiente, viene contaminata dalle più svariate forme batteriche (saprofite e patogene) che su di essa trovano condizioni più o meno favorevoli alla loro vita.

Infatti oltre ad un'adatta temperatura i microrganismi vi trovano anche un sufficiente grado d'umidità ed un conveniente terreno nutritivo, costituito dai detriti degli strati più superficiali dell'epidermide che vanno in isfacelo, e dalle secrezioni delle ghiandole sebacee e sudorifere (Marchoff). Le anfrattuosità innumerevoli che offre la pelle e i dotti delle sue numerose glandule costituiscono poi dei recessi ben adatti al tranquillo sviluppo di una flora batterica così svariata e così rigogliosa, la quale ci è ben nota per gli studi di una lunga serie di osservatori (Ebert, Bizzozero, Bordoni Uffreduzzi, Bochardt, Furbingen, Mittmann, Maggiora, Rosenbach, Babés, Tommasoli, Unna, Sehlen, Preindersberger, Nikolschi, Marchnoff, Wigura, Remlinger, Di Mattei, Binaghi).

Ma fortunatamente la provvida struttura anatomica del rivestimento cutaneo, coi numerosi strati cornei ed epiteliali offre una barriera formidabile alla invasione dell'organismo per parte di questi ospiti pericolosi.

Per molto tempo si ritenne infatti che perchè si verificasse una infezione per la via cutanea, era necessaria la esistenza di una so-

luzione di continuo, sia pure minima, di un micro-trauma che potesse offrire una breccia alla penetrazione dei microrganismi. Ma avendo l'Escherich riscontrato in tutti i casi da lui osservati di ascessi cutanei da stafilococco piogene aureo la completa assenza di ferite o di minime discontinuità della pelle, ciò che deponeva evidentemente per la penetrazione degli agenti infettivi attraverso il tegumento cutaneo, cominciarono a sorgere dei forti dubbi sulla assoluta impermeabilità della pelle intatta alle invasioni microbiche. E numerose sono state le ricerche istituite sopra tale importante quistione:

Garré, volendo per il primo confermare sperimentalmente l'etiologia degli ascessi della pelle, strofinò sulla cute intatta del suo avambraccio una certa quantità di cultura di stafilococco piogene aureo. Dopo 6 ore cominciò ad avvertire un bruciore intenso e poscia sulla zona sottoposta allo esperimento notò la formazione di circa 20 pustole, una delle quali dopo 4 giorni si trasformò in antrace. I risultati di questa esperienza stabilivano quindi che la cute intatta non era una sicura protezione all'invasione batterica.

Alla stessa conclusione pervenne il Bochardt, il quale, avendo fatto seguire alle esperienze l'esame isto-batteriologico di un pezzo di cute, osservò anche che il virus era penetrato attraverso i dotti escretori delle ghiandole cutanee e dei bulbi piliferi.

Roth dimostrò anche lui con esperienze su animali che l'epidermide intatta si lascia attraversare sia pure con difficoltà dai microrganismi. Strofinata sull'orecchio depilato di una cavia una cultura virulenta di carbonchio mista a lanolina, l'animale morì per infezione carbonchiosa. Risultati negativi ebbe sperimentando coi conigli.

Schimmelbusch, strofinata sulla coscia di un individuo affetto da pioemia una grande quantità di cultura pura di stafilococco piogene aureo, notò la comparsa di ascessolini, che si cambiarono ben presto in furuncoli. Dopo la morte dell'individuo notò, con le osservazioni microscopiche, che la cute della coscia non presentava alcuna discontinuità e che gli stafilococci erano penetrati attraverso la radice dei peli.

Machnoff, strofinando fortemente sulla cute di alcuni animali culture virulente di carbonchio miste a lanolina, vide morire tutti gli animali con l'infezione carbonchiosa. Risultati ben differenti ebbe quando il materiale culturale venne strofinato dolcemente. Da ciò concluse che soltanto una forte strofinazione sotto pressione può dar luogo ad una infezione, mentre il toccare o lo strofinare dolcemente sulla pelle un materiale infetto non determina mai la penetrazione di microrganismi.

Babés e Cornil dimostrarono che anche i bacilli della morva possono, seguendo i follicoli piliferi, penetrare attraverso la cute intatta nelle vie linfatiche.

Wasmuth poi nel 1892 dopo una lunga serie di esperienze, praticate sopra se stesso e sopra gli animali con culture pure di stafilococco piogene aureo, venne anche lui alla conclusione che la superficie cutanea intatta degli uomini e degli animali si lascia attraversare dai microrganismi, e che

questi penetrano tra il fusto e la guaina del pelo, mentre non servono al passaggio nè le ghiandole sebacee del pelo, nè le ghiandole sudorifere.

Enaux, Chaussier e Kondorsky riuscirono anche loro a produrre l'infezione carbonchiosa in alcune cavie strofinando sulla loro cute culture virulente di carbonchio.

Perez ha in questo Istituto intrapreso delle esperienze in proposito nell'intento di vedere, se era possibile, a cute intatta la penetrazione dei germi attraverso la pelle nei gangli linfatici.

Strofinando emulsioni di culture in agar di stafilococco piogene aureo e di prodigioso sulla cute dell'addome di alcune cavie, dopo averne accuratamente tagliati i peli, senza produrre lesione alcuna di continuo, osservò che i suddetti microrganismi oltrepassavano la barriera cutanea e s'introducevano nelle vie linfatiche; li rintracciava infatti dopo alquante ore (12 ore) nei gangli sottocutanei.

Binaghi, avendo spalmato sulla cute integra dell'uomo culture pure di alcuni microrganismi isolati dalla cute stessa dell'uomo e trovato che tali microrganismi protetti dagli agenti esterni e dalle cause d'attrito, giusto gli esami fatti a diverso periodo di tempo, andavano gradatamente e notevolmente diminuendo di numero sino a divenire assai pochi, concluse senza altro che la pelle era dotata di un'azione *microbicida*. Ed avendo insistito su questa serie di esperienze venne a trovare che il bacillo coli, un similtifo, lo stafilococco piogene aureo, lo stafilococco piogene albo, il diplococco lanceolato di Fränkel, e perfino il bacillo tubercolare subiscono, per azione speciale della cute, non solo una diminuzione nel loro numero, ma anche un'attenuazione notevole nella loro virulenza. E dai risultati di queste esperienze l'autore venne alla conclusione che la cute non è soltanto un organo di protezione contro gli agenti fisici e chimici del mondo esterno, ma è un organo di difesa contro i parassiti che ospita sui quali spiega una *vera e propria azione disinfettante* (attenuatrice e microbicida).

Recentemente poi il prof. Manfredi istituendo delle esperienze sulla permeabilità della pelle per il virus tubercolare, venne alla conclusione che a pelle integra i bacilli tubercolari possono facilmente penetrare nell'interno dell'organismo delle cavie e dei conigli con l'aiuto di semplici pressioni o strofinazioni esercitate al disopra della cute: mentre però nelle cavie i bacilli invasori, dopo di aver prodotto o non ulceri tubercolari nel sito d'ingresso e dopo essersi soffermati in diverse tappe ganglionari, si generalizzano infine nell'organismo, sebbene vadano via via perdendo della loro virulenza; nei conigli i bacilli senza produrre un'alterazione della cute, si arrestano nei gangli linfatici della rispettiva regione, dove vengono attenuati nella loro virulenza con straordinaria rapidità.

I risultati finora ottenuti tendono quindi a farci ammettere che il tegumento cutaneo non offre una barriera insuperabile all'urto dei nemici microscopici. La sua resistenza alla loro penetrazione cede invece pel concorso di varii fattori: potere d'infettività massimo rispetto alla specie animale adoperata, quantità rilevante del materiale infettante, forte pressione e forte strofinazione (modalità favorevoli forse alla formazione di microtraumi). Solo il Binaghi

attribuisce alla pelle un particolare potere di difesa, consistente in un meccanismo di attenuazione o distruzione dei batteri dovuto all'azione dei suoi secreti. Di fronte a tali divergenze ho voluto, per consiglio del prof. Manfredi, ripigliare questo importante argomento per verificare i risultati fin qui avuti dagli altri sperimentatori. E mi sono proposto in primo luogo di constatare:

I. Se i batteri patogeni penetrano effettivamente attraverso la cute integra di animali allo stato fisiologico, determinando una infezione sia locale che generale, solo sotto l'azione d'una forte pressione e strofinazione.

II. Se taluni disturbi generali ai quali può andare incontro l'organismo animale, ne facilitano la penetrazione e la conseguente infezione.

I microrganismi con cui ho sperimentato sono i seguenti:

1° Bacillo del carbonchio;

2° Diplococco di Fränkel;

3° Bacillo della morva;

4° Stafilococco piogeno aureo.

Non ho sperimentato sul bacillo tubercolare, essendosi di ciò occupato in modo esauriente il prof. Manfredi.

Come animali di esperimento ho adoperato i conigli e le cavie.

Gli animali venivano sottoposti ai seguenti disturbi:

1° Digiuno;

2° Freddo (secco ed umido);

3° Calore (secco ed umido);

4° Iniezioni di sostanze narcotizzanti;

5° Iniezioni di sostanze diaforetiche.

Il pelo della regione nella quale doveva essere strofinato il materiale culturale, veniva accuratamente tagliato mercè forbici curve sul piatto.

E ci siamo serviti delle forbici anzichè del rasoio, prima di tutto per evitare di produrre delle lesioni sia pure minime, e poi per lasciare attaccato alla cute un po' di pelo e così riprodurre per quanto fosse possibile le condizioni naturali.

Il materiale culturale veniva poi strofinato con o senza pressione mercè una bacchetta di vetro perfettamente liscia e l'animale, dopo tale strofinazione restava, per circa 10′ a 15′ immobile, in modo da non fare detergere il materiale spalmato.

PARTE PRIMA

Esperienze sugli animali allo stato normale.

1. *Carbonchio.*

Il materiale di esperimento era costituito, nella maggior parte dei casi, da una densa emulsione in acqua sterile di patine di culture di carbonchio in agar di 48 ore (di solito la patina di una cultura veniva finamente emulsionata in 4 cmc. d'acqua sterile). Le culture adoperate furono rese assai virulente mercè passaggi negli animali. La dose di $^{1}/_{100}$ di cmc. inoculata per la via sottocutanea produceva la morte delle cavie in 36 ore, dei conigli in 48-50 ore.

In alcune esperienze poi venivano adoperate le culture in brodo di 48 ore, e ciò allo scopo di potere meglio dosare il materiale d'esperimento. Il materiale veniva strofinato sulla superficie cutanea di diverse regioni (dorsale, addominale, ascellare, inguinale), sia non esercitando alcuna pressione, sia esercitando una forte pressione. Nelle seguenti tabelle riassumo le esperienze fatte.

TABELLA I. — ESPERIENZE COL BACILLO DEL CARBONCHIO.

Materiale strofinato sotto forte pressione.

Numero d'ordine	Animale di esperimento	Peso dell'animale in gr.	Data dell'esperimento	Quantità di materiale strofinato in cmc	Regione in cui viene strofinato il materiale	Esito	Osservazioni
1	Cavia	400	20 febbraio	0.5 emulsione	Addominale	Morta dopo 40 ore circa.	Per infezione carbonchiosa.
2	Id.	390	Id.	Id.	Dorsale	Id. 36 »	
3	Id.	410	Id.	Id.	Ascellare	Id. 38 »	
4	Id.	415	Id.	Id.	Inguinale	Id. 40 »	
5	Coniglio	1000	Id.	Id.	Addominale	Id. 3 giorni.	
6	Id.	1080	Id.	Id.	Dorsale	Id. 48 ore circa.	
7	Id.	1100	Id.	Id.	Ascellare	Id. 48 »	
8	Id.	1020	Id.	Id.	Inguinale	Id. 48 »	
9	Cavia	420	18 marzo	0.1 Id.	Addominale	Id. 3 giorni.	
10	Id.	400	Id.	Id.	Dorsale	Id. 3 giorni circa	
11	Id.	410	Id.	Id.	Ascellare	Id. 3 »	
12	Id.	430	Id.	Id.	Inguinale	Id. 3 »	
13	Coniglio	1100	Id.	Id.	Addominale	Id. 5 giorni.	
14	Id.	1080	Id.	Id.	Dorsale	Id. 4 »	
15	Id.	1070	Id.	Id.	Ascellare	Id. 4 »	
16	Id.	1000	Id.	Id.	Inguinale	Id. 4 »	
17	Cavia	395	2 maggio	$^1/_{50}$ brodo-cult.	Addominale	Vive.	
18	Id.	410	Id.	Id.	Dorsale	Id.	
19	Coniglio	995	Id.	$^1/_{25}$ Id.	Addominale	Id.	
20	Id.	1015	Id.	Id.	Dorsale	Id.	
21	Cavia	420	28 maggio	Id.	Addominale	Morta dopo 3 giorni.	Per infezione carbonchiosa.
22	Id.	400	Id.	Id.	Dorsale	Id. 52 ore.	
23	Coniglio	1100	Id.	$^1/_{10}$ Id.	Addominale	Id. 4 »	
24	Id.	1080	Id.	Id.	Dorsale	Id. 4 »	

TABELLA II. — ESPERIENZE COL BACILLO DEL CARBONCHIO.

Materiale strofinato senza alcuna pressione.

Numero d'ordine	Animale di esperimento	Peso dell'animale in gr.	Data dell'esperimento	Quantità di materiale strofinato in cmc.	Regione in cui viene strofinato il materiale	Esito	*Osservazioni*
1	Cavia	390	20 febbraio	0.5 emulsione	Addominale	Morta dopo 52 ore.	Per infezione carbonchiosa.
2	Id.	380	Id.	Id.	Dorsale	Id. 50 »	
3	Id.	400	Id.	Id.	Ascellare	Id. 48 »	
4	Id.	410	Id.	Id.	Inguinale	Id. 48 »	
5	Coniglio	1000	Id.	Id.	Addominale	Id. 4 giorni.	
6	Id.	980	Id.	Id.	Dorsale	Id. 4 »	
7	Id.	990	Id.	Id.	Ascellare	Id. 4 »	
8	Id.	970	Id.	Id.	Inguinale	Id. 4 »	
9	Cavia	400	18 marzo	0.1 Id.	Addominale	Id. 6 »	
10	Id.	360	Id.	Id.	Dorsale	Id. 6 »	
11	Id.	350	Id.	Id.	Ascellare	Id. 5 »	
12	Id.	380	Id.	Id.	Inguinale	Id. 5 »	
13	Coniglio	990	Id.	Id.	Addominale	Id. 6 »	
14	Id.	1100	Id.	Id.	Dorsale	Id. 6 »	
15	Id.	1000	Id.	Id.	Ascellare	Id. 6 »	
16	Id.	1020	Id.	Id.	Inguinale	Id. 6 »	
17	Cavia	390	2 maggio	$^1/_{50}$ brodo-cult.	Addominale	Vive.	
18	Id.	385	Id.	Id.	Dorsale	Id.	
19	Coniglio	1000	Id.	$^1/_{25}$ Id.	Addominale	Id.	
20	Id.	990	Id.	Id.	Dorsale	Id.	
21	Cavia	380	18 maggio	Id.	Addominale	Morta dopo 4 giorni.	Per infezione carbonchiosa.
22	Id.	395	Id.	Id.	Dorsale	Id. 3 »	
23	Coniglio	1010	Id.	$^1/_{10}$ Id.	Addominale	Id. 6 »	
24	Id.	1000	Id.	Id.	Dorsale	Id. 5 »	

Dai risultati delle precedenti esperienze si rileva che:

I bacilli del carbonchio strofinati a dosi non minime sulla cute di qualsiasi regione (addominale, dorsale, ascellare, inguinale) degli animali (cavie, conigli) sia sotto forte pressione, sia senza alcuna pressione, determinano sempre l'infezione carbonchiosa. Non si ha l'infezione solo quando il numero dei bacilli che si strofina è addirittura minimo (250 in media per le cavie, 500 per i conigli). È qui da fare rilevare che gli animali sottoposti alla strofinazione con forte pressione muoiono più presto di quelli strofinati senza pressione.

2. *Diplococco di Fränkel.*

Come materiale di esperimento mi sono servito di culture in brodo di 24 ore virulentissime. (I conigli inoculati per la via sottocutanea con 1/40 di cmc. di brodo-cultura morivano per setticemia diplococcica in circa 24 ore).

Ho sperimentato sui conigli come gli animali più sensibili a tale infezione. Si strofina sia senza alcuna pressione, sia con forte pressione sulla cute di diverse regioni (addominale, dorsale, ascellare ed inguinale) di n. 14 conigli quantità variabili (2-10 cmc.) di cultura in brodo di diplococco di 24 ore.

Un solo coniglio muore dopo 54 ore per infezione diplococcica: tutti gli altri sopravvivono.

Come si vede contro 13 risultati negativi non abbiamo avuto che un solo risultato positivo, diremo quindi che: Il diplococco di Fränkel, strofinato in quantità notevole sia senza alcuna pressione, sia sotto forte e prolungata pressione sulla cute di animali suscettibilissimi all'infezione (conigli) non esercita nella grande maggioranza dei casi alcuna influenza patogena.

3. *Morva.*

Si adoperano emulsioni di cultura in agar di 48 ore. Tali emulsioni iniettate nel cavo peritoneale alla dose di cmc. 0.1, determinano la morte delle cavie in 48 ore. Come animali si adoperano le cavie (maschi). Le regioni scelte per la strofinazione del materiale furono l'addominale e le inguinali.

TABELLA III. — ESPERIENZE COL BACILLO DELLA MORVA.

Numero d'ordine	Animale di esperimento	Peso dell'animale in gr.	Data dell'esperimento	Quantità di materiale strofinato in cmc.	Regione in cui viene strofinato il materiale	Esito	Osservazioni
				Materiale strofinato sotto forte pressione.			
1	Cavia	400	16 giugno	1 emulsione	Addominale	Morta dopo 7 giorni	Per infezione morvosa.
2	Id.	390	Id.	Id.	Inguinale	Id. 5 »	
3	Id.	380	25 giugno	1 goccia	Addominale	Vive	Nulla di patologico.
4	Id.	370	Id.	Id.	Inguinale	Id.	
5	Id.	410	3 luglio	0. 2 emulsione	Addominale	Id.	Già dopo 48 ore ingrossamento dei testicoli, ascessi ed ulcerazioni dello scroto.
6	Id.	420	Id.	Id.	Id.	Id.	
7	Id.	400	Id.	Id.	Inguinale	Id.	
8	Id.	390	Id.	Id.	Id.	Id.	
				Materiale strofinato senza alcuna pressione.			
1	Cavia	380	16 giugno	1 emulsione	Addominale	Morta dopo 10 giorni	Per infezione morvosa.
2	Id.	365	Id.	Id.	Inguinale	Id. 9 »	
3	Id.	390	25 giugno	1 goccia	Addominale	Vive	Nulla di anormale.
4	Id.	420	Id.	Id.	Inguinale	Id.	
5	Id.	410	3 luglio	0. 2 emulsione	Addominale	Id.	Leggiero ingrossamento dei testicoli, ascessi ed ulcerazioni dello scroto.
6	Id.	400	Id.	Id.	Id.	Id.	
7	Id.	430	Id.	Id.	Inguinale	Id.	
8	Id.	395	Id.	Id.	Id.	Id.	

Dalla precedente tabella si rileva che: i bacilli della morva strofinati sulla cute, sia sotto forte pressione che senza alcuna pressione, determinano sempre l'infezione solo quando il materiale è abbondante.

Le dosi medie determinano solo ingrossamento dei testicoli, ascessi multipli, ed ulcerazioni dello scroto, ecc., fatti che debbono considerarsi come sintomi di un'infezione attenuata. Le dosi minime non determinano alcuna alterazione.

4. *Stafilococco piogeno aureo.*

Adopero dense emulsioni in acqua sterile di culture in agar di stafilococco aureo di 48 ore (cmc. 0. 1 di questa emulsione inoculata nel sottocutaneo uccideva le cavie in 48 ore circa). Le esperienze vengono praticate su cavie e conigli.

Si strofina sotto forte pressione sulla cute di diverse regioni (addominale, dorsale, ascellare, inguinale, auricolare) di n. 20 cavie e 10 conigli una quantità variabile (1-4 cmc.) della suddetta emulsione.

Tutti gli animali sopravvivono senza presentare alcun fenomeno patologico sia locale che generale.

Quindi lo stafilococco piogeno aureo, virulento, spalmato a grande dose e sotto una forte e prolungata pressione sulla cute delle cavie e dei conigli non determina mai alcun fenomeno patologico nè locale, nè generale.

Ora dall'insieme delle ricerche fin qui riferite risulta che alcune forme batteriche (carbonchio, morva) strofinate sulla cute sia sotto forte pressione, sia senza alcuna pressione, determinano infezione generale solo quando sono in grande numero.

Altre forme invece (diplococco, stafilococco) strofinate anche a dosi altissime sotto forte e prolungata pressione, non determinano alcuna alterazione.

PARTE SECONDA.

Esperienze sugli animali sottoposti a disturbi generali.

1. — *Carbonchio.*

Esperienze col bacillo del carbonchio strofinato fortemente in piccolissima quantità.

a) *Digiuno*:

Sapendo per esperienze da me istituite e riferite in altro mio lavoro che i conigli resistono al digiuno anche per 9-10 giorni e le cavie per 4-5

giorni, ho privato del cibo le cavie per 4 giorni, i conigli per 9 giorni. Gli animali vengono sottoposti al digiuno:

a) prima della strofinazione;

b) dopo la strofinazione;

c) prima e dopo la strofinazione.

La quantità di materiale adoperato è addirittura minima (1/25 di cmc. di brodo-cultura di carbonchio di 48 ore per i conigli, 1/50 di cmc. per le cavie), quantità che come abbiamo visto non determina infezione negli animali allo stato normale.

b) *Freddo* (secco ed umido):

In queste esperienze mi sono servito di una comune ghiacciaia. La temperatura dello spazio interno, dove venivano posti gli animali, era mantenuta quasi costantemente a 0° nel caso della perfrigerazione secca; a 5° circa nella perfrigerazione umida, la quale veniva determinata aggiungendo un po' di acqua al fondo del recipiente interno dove stavano appunto gli animali. Tutti gli animali da esperimento posti nella ghiacciaia sono costantemente accompagnati da un animale di controllo. Anche qui gli animali vengono sottoposti alla perfrigerazione prima, dopo, e tanto prima che dopo la strofinazione.

c) *Calore* (secco ed umido):

Come calorifero mi sono servito di un comune termostato. Per ottenere il caldo umido facevo passare mercè un tubo di vetro attraverso uno dei fori del termostato una corrente continua di vapore acqueo. L'umidità relativa dell'aria dell'ambiente, misurata mercè un psicrometro posto dentro il termostato, era in media del 73 per cento. Sapendo per le mie precedenti esperienze sopra accennate che la temperatura massima alla quale resistono i conigli è di 39° al calore secco e di 38° al calore umido, ed essendomi assicurato con nuove esperienze che le cavie resistono presso a poco alla stessa temperatura per un tempo però meno lungo, ho sottoposto i conigli alla temperatura di 38° (calore umido) e 39° (calore secco) per 48 ore; e le cavie alla stessa temperatura per circa 12 ore. L'azione del calore viene fatta subire agli animali prima, dopo e tanto prima che dopo la strofinazione.

d) *Iniezioni di sostanze diaforetiche* (pilocarpina).

Si inietta alle cavie 1/10 di mmgr. ed ai conigli 2/10 di mmgr. di pilocarpina.

Il materiale culturale viene strofinato ora prima ora dopo che gli animali hanno subito l'iniezione di pilocarpina. Le regioni scelte per le strofinazioni sono le ascellari e le inguinali come quelle dove sono più numerose le ghiandole sudorifere.

e) *Iniezioni di sostanze narcotizzanti* (cloralio idrato, cloroformio).

Nei conigli vengono praticate le iniezioni endovenose di idrato di cloralio (0.30 gm. per animale del peso medio di 1000-1200 gm.). Nelle cavie riuscendo difficili le iniezioni endovenose si pratica la cloroformizzazione (sino a completa narcosi).

L'influenza di ciascun disturbo viene esperimentata rispettivamente su 4 cavie e 4 conigli.

Sulla cute di ciascun animale, sottoposto ad uno dei suddetti disturbi, si strofina sotto forte pressione cultura in brodo di carbonchio di 48 ore (1/50 cmc. per le cavie, 1/25 cmc. per i conigli).

Tutti gli animali sopravvivono.

I disturbi generali sperimentati quindi non influenzano per nulla la penetrazione e la consecutiva infezione attraverso la pelle da parte di uno scarso numero di bacilli carbonchiosi.

2. *Morva.*

Esperienze col b. della morva strofinato in quantità piccola.

Come materiale si adoperano emulsioni di culture di morva in agar di 48 ore (4 cmc. d'acqua per la patina di una cultura).

Sulla cute della regione inguinale di ciascuna cavia si strofina con forte pressione una goccia della suddetta emulsione.

Per ciascuno dei disturbi precedentemente descritti, si sperimenta su 4 cavie.

Tutti gli animali sopravvivono senza presentare alcun disturbo.

I risultati costantemente negativi dimostrano che: i bacilli della morva strofinati in piccola quantità sulla cute delle cavie sottoposte a disturbi generali, non determinano infezione.

3. *Diplococco di Fränkel.*

Adopero come materiale di esperimento culture in brodo di 24 ore virulentissime.

Anche qui l'infuenza di ciascun disturbo generale viene sperimentata rispettivamente su 4 conigli. La strofinazione è praticata con forte pressione; il materiale strofinato è piuttosto abbondante (cmc. 2-5 di cultura).

Tutti gli animali sopravvivono; ad eccezione di 1 (su 4) sottoposto alla perfrigerazione umida prima e dopo la strofinazione per un periodo di 8 ore circa, e di 1 (su 4) sottoposto alla iniezione endovenosa d'idrato di cloralio.

I disturbi generali sperimentati adunque, nella maggior parte dei casi, non hanno nei conigli alcuna influenza sulla penetrazione dei diplococci di Fränkel attraverso la cute, e diciamo nella maggior parte dei casi, perchè i due soli risultati positivi avuti colla perfigerazione e coll'iniezione di cloralio ci inducono a ritenere che talvolta in determinate condizioni tali disturbi possono facilitare la penetrazione dei diplococci e quindi l'infezione.

4. *Stafilococco piogeno aureo.*

Adopero dense emulsioni di culture in agar di 48 ore virulente.

Per ciascuno dei precedenti disturbi si esperimenta rispettivamente su 4 cavie e 4 conigli, facendo sempre accompagnare le esperienze da un animale di controllo.

Il materiale strofinato è abbondante (1-2 cmc.).

Tutti gli animali sperimentati sopravvivono senza presentare alcun disturbo.

Diremo quindi che: lo stafilococco piogeno aureo strofinato sotto forte pressione e in grande quantità sulla cute degli animali da esperimento (cavie, conigli) non determina mai alcun fenomeno patologico nè generale nè locale.

***

I risultati delle mie esperienze dimostrano pertanto che la difesa, che offre la superficie cutanea contro i batteri patogeni non è affatto costante, infatti mentre essa allo stato normale è insufficiente contro alcuni [carbonchio, morva, tubercolosi (Manfredi)] strofinati anche in piccola quantità, è sufficiente invece, nella grande maggioranza dei casi, contro altri (stafilococco piogeno aureo, diplococco di Fränkel), strofinati ad alte dosi anche quando vengono disturbati notevolmente i poteri fisiologici dell'organismo animale. Ora perchè tale diversità di comportamento tra alcune forme batteriche ed altre?

Diciamo subito che questa differenza di comportamento non può logicamente attribuirsi ad un contegno diverso della resistenza meccanica della pelle di fronte ai vari agenti infettanti. Potrebbe pensarsi a proprietà biologiche diverse delle due categorie di batteri, che facilitano od impediscono rispettivamente la loro penetrazione; ma è più conforme ai principii, fin qui acquisiti dalla batteriologia, attribuire la diversità dei risultati alla varia resistenza delle specie batteriche di fronte ai soliti agenti di difesa. E allora non resta che pensare o ad una speciale azione disinfettante della pelle (Binaghi), per quanto le esperienze e i criteri su cui è fondata tale ipotesi non sono punto probativi, o ai noti meccanismi di resistenza, il cui contegno è notoriamente vario di fronte al vario potere infettante delle specie microbiche. E, avendo seguito i lavori intrapresi in questo istituto dal professore Manfredi e dal Perez, i quali

hanno dimostrato come i batteri penetrati nell'organismo sotto certe condizioni vengono arrestati dai gangli e quivi attenuati ed uccisi, siamo stati condotti a pensare se mai in questo meccanismo non si potesse trovare la spiegazione dei risultati più sopra riferiti.

Abbiamo a tale scopo strofinato senza alcuna pressione sulla cute dei quadranti inferiori dell'addome di 4 conigli rispettivamente 2 cmc. di una cultura in brodo virulenta di diplococco di Fränkel. Non abbiamo quì adoperato alcuna pressione per non agevolare la penetrazione dei germi attraverso i dotti delle glandole cutanee. A vari intervalli (2, 4, 6, 8 ore) dopo accurata disinfezione della pelle veniva scollato ampiamente il tratto di cute su cui si era spalmato il virus, prelevati i pezzi di tessuto cellulare sottocutaneo ed i gangli sottocutanei (inguinali superficiali), e degli uni e degli altri venivano fatti preparati e culture.

Già dopo due ore l'esame microscopico e culturale mostrava la presenza dei diplococchi nel cellulare sottocutaneo; mentre solo alle 6ª ora fu dato di rilevare dal solo esame culturale la presenza del diplococco nei gangli.

Questa constatazione diretta veniva pertanto ad escludere che la pelle avesse un'azione battericida, per lo meno apprezzabile e veniva a dimostrare che i batteri spalmati sulla superficie cutanea per il tramite del cellulare sottocutaneo arrivano ai gangli.

Dimostrato che la pelle non aveva azione battericida apprezzabile, era interessante vedere se fosse per caso dotata di azione attenuante.

A tal'uopo abbiamo strofinato sulla cute di due conigli una certa quantità di cultura in brodo di diplococco e dopo 2, 4 e 6 ore col solito metodo abbiamo estirpato pezzetti di cellulare sottocutaneo e i gangli sottocutanei e fatte culture in brodo. Culture venivano nello stesso tempo fatte dalla cultura originale, che era servita per la strofinazione. Dopo 24 ore venivano inoculate nel peritoneo di alcuni conigli eguali quantità di brodo culturale (1/10 di cmc.). Gli animali inoculati col materiale di controllo e col materiale proveniente dal cellulare sottocutaneo sono morti dopo 36 ore circa; quello inoculato col materiale proveniente dai gangli estirpati dopo 6 ore, morì dopo 40 ore circa. Da ciò risulta che i diplococci di Fränkel sorpresi nel cellulare sottocutaneo e perfino nei gangli non hanno subìto nel passaggio attraverso la pelle alcuna attenuazione. Ed il trovare i diplococci ancora virulenti nei gangli dopo 6 ore non può infirmare il principio dell'azione protettiva dei gangli, perchè per le ricerche fatte in questo Istituto (vedi lavori

prof. Manfredi e Perez citati nella bibliografia), sappiamo che i gangli trattengono nelle maglie del loro reticolo i batteri e li attenuano dopo un certo tempo, non mai nelle prime ore.

Cosicchè dobbiamo ritenere che i batteri penetrati attraverso la cute si mantengano virulenti per tutto il loro viaggio attraverso le vie linfatiche sino ai gangli che li arrestano e tendono a privarli del loro potere infettante.

Tutti i batteri sperimentati dunque oltrepassano la barriera cutanea, ma il loro comportamento di fronte all'organismo è diverso secondo che la loro resistenza può essere oppur no sopraffatta dall'azione specifica dei vari mezzi di resistenza e principalmente dei gangli.

Si è infatti dimostrato in questo Istituto che i gangli mentre reagiscono potentemente verso l'infezione tifosa, reagiscono in una maniera limitata all'infezione carbonchiosa e tubercolare in modo da rendere possibile l'infezione dietro l'inoculazione per la via linfatica, però di dosi di gran lunga superiori a quelle che riescono letali per qualunque altra via.

Nessuna meraviglia quindi che mentre il carbonchio, la morva e la tubercolosi determinano l'infezione anche attraverso la cute intatta, lo stafiloccco piogeno aureo ed il diplococco di Fränkel (forme notoriamente poco resistenti) vengano ad essere fortemente attenuati attraverso il filtro gangliare. Riassumendo quindi possiamo concludere che la pelle, ritenuta per tanto tempo barriera insormontabile, si lascia invece facilmente attraversare da tutte le forme batteriche sperimentate, e che quando non si ha l'infezione ciò avviene molto probabilmente per l'azione filtrante e battericida che i gangli linfatici spiegano di fronte ai germi patogeni.

Si rileva anche dalle nostre esperienze che l'azione protettiva che i gangli spiegano a favore dell'organismo per quanto riguarda la penetrazione dei batteri patogeni attraverso la cute integra, non viene ad essere, nella grandissima maggioranza dei casi, indebolita da nessuno dei disturbi generali sperimentati cui può andare incontro l'organismo. Perchè la barriera difensiva dei gangli venga superata è necessario però che il numero dei batteri invasori sia considerevole; e ciò è dovuto in parte probabilmente alla relativa protezione meccanica che la cute esercita in difesa dell'organismo. Abbiamo visto difatti che una forte strofinazione può facilitare il prodursi dell'infezione, forse perchè viene a spingere meccanicamente i batteri nei dotti delle glandole cutanee.

È questa evidentemente la ragione per cui nelle condizioni

naturali sono così rare le infezioni a cute integra, poichè è assai difficile che in condizioni naturali gli uomini o gli animali possano trovarsi in contatto con un numero così grande di germi patogeni come quello che viene adoperato nelle condizioni sperimentali.

Ecco forse perchè la pelle è stata per tanto tempo ritenuta barriera insormontabile alla penetrazione dei batteri.

Infatti nella maggior parte dei casi i presidii di difesa di cui la natura ha dotato gli organismi superiori contro gli assalti dei nemici microscopici, che insidiano per la via cutanea la loro vitalità, anche quando vengano disturbati notevolmente i poteri fisiologici dell'organismo, compiono ottimamente l'ufficio che loro è stato affidato.

BIBLIOGRAFIA.

BABES. *De la pénétration des bacilles de la morve à travers la peau saine.* Bullet. de l'Acad. de méd., 20 mai, 1890.

BINAGHI. *Della disinfezione e del potere disinfettante della cute umana.* Policlinico, sezione chirurgica, IV. 1897.

BIZZOZZERO. *Ueber die Mikrophiten der normalen Oberhaut des Menschen.* Virchow's Arch. V. 98, 1884.

BOCKHART. *Ueber die Aetiologie und Therapie der Impetigo, des Furunkels und der Sykosis.* Monatshefte für prakt. Dermatologie, vol. IV, 1887.

BORDONI UFFREDUZZI. *Ueber die biologischen Eigenschaften der normalen Hautmikrophyten.* Fortschritte der Medic. 1886, n. 5.

CORNIL. *Sur la pénétration des bacilles de la morve à travers la peau intacte.* La Semaine méd., 1890, n. 22.

DI MATTEI. Bollettino della Regia Accademia medica di Roma, anno XV, 1888-89.

ESCHERICH. Münchner medizinische Wochenschrift, n. 50-52.

FÜRBINGEN. *Untersuchungen und Vorschriften ueber die Desinfection der Hände der Artzes,* ecc. Wiesbaden, 1888.

GARRÉ. *Zur Aetiologie acut einiger Entzündungen.* Fortschritte der Medic., 1885, Bd. III.

KONDORSHI M. K. *Fall von Milzbrand Infection durch die unnerletzte Haut.* Wratsch. 1891, n. 33.

MACHNOFF S. D. *Zur Frage über den Durchgang von Bakterien durch die Haut beim Einreiben.* Russkaia Medicina, 1889, n. 39. (Dal Centr. f. Bakt. 1890, Bd. VII, p. 441.

MAGGIORA. *Contributo allo studio dei microfiti della pelle umana normale e specialmente del piede.* Giornale della R. Società italiana d'Igiene, volume II, pag. 335, 1889.

MANFREDI L. *Sull'importanza del sistema gangliare linfatico nella dottrina moderna dell'infezione e della immunità.* Giornale internazionale delle

Scienze mediche, 1898; Virchow' s, 155. Band, 1899; Lavori dell'Istituto d'igiene di Palermo, vol. IV, 1898.

MANFREDI L. e VIOLA P. *Influenza dei gangli linfatici nella produzione dell'immunità verso le malattie infettive.* Lavori dell'Istituto d'igiene, regia Università di Palermo, vol. IV, 1898; questi Annali, Roma, 1899; Zeitschr. f. Hygiene u. Infectionsk., 1899, XXX. Bd.

MANFREDI con la collaborazione del dott. FRISCO B. *I gangli linfatici nella difesa dell'organismo contro la tubercolosi.* Lavori dell'Istituto d'igiene, R. Università di Palermo, vol. V, 1899-1901; Policlinico, sezione chirurgica, nn. 37, 48 e 52; Atti della Regia Accademia medica di Palermo, 1901.

MARCHOFF. *Zur Frage der Hautverunreinigung der Kranken durch die Mikroorganismen.* Centr. f. Bakt., 1896, Bd. XX.

MITTMANN. *Untersuchungen von Fingernagelschmutz auf Mikrooganismen.* Virchow' s Archiv. vol. CXIII, pag. 203.

NIKOLSKI S. M. *Materialen zur Lehere von der Beschmutzung der Haut von Kranken mit Bacterien.* Wratsch, 1893, n. 13, Russisch; Centralblatt für Chirurgie, v. 29, 1893.

PEREZ G. *Modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi.* — Parte I. *Parassitismo microbico latente nei gangli linfatici normali.* Questi Annali, Roma, vol. VII, 1897; Lavori dell'Istituto d'igiene della R. Università di Palermo, vol. III, 1898. — Parte II. *I gangli linfatici nelle infezioni.* Lavori dell'Istituto d'igiene della R. Università di Palermo, vol. III, 1897; Questi Annali, Roma, 1898, vol. VIII; Centralblatt für Bacteriologie, 1898.

PREINDESBERGER. *Zur Kenntniss der Bacterien des Unternagelsraumes und zur Desinfection der Hände.* Centralblatt für Bakt., vol. X, pag. 134, 1891.

REMLINGER. *Les microbes de la peau humaine.* Méd. moderne, 1896, nn. 33-35.

ROTH. *Ueber das Verhalten der Schleimhäute und der äusseren Haut in Bezug auf ihre Durchlässigkeit für Bacterien.* Zeitschrift für Hygiene, 1888, Bd. IV, pag. 151.

SCHIMMELBUSCH. *Ueber die Ursachen der Furunkel.* Arch. f. Ohrenheilkunde, 1889, Bd. XXVII, Heft 4, pag. 552.

SEHLEN. *Flora dermatologica.* Monatsch. f. prakt. Dermat. 1890-1891, XXI, XXII.

SIMONCINI G. B. *Della penetrazione dei batteri patogeni attraverso l'intestino allo stato normale e sotto l'influenza di disturbi generali dell'organismo.* Lavori dell'Istituto d'igiene della R. Università di Palermo, vol. II, 1896; Questi Annali, Roma, vol. VII, 1897.

TOMMASOLI. *Studii sulla balanopostite ricorrente, con contributo alla flora dermatologica.* Giornale italiano delle malattie veneree e della pelle, 1888, XI.

WASMUTH. *Ueber Durchgängigkeit der Haut für Mikroben.* Centr. f. Bakt., 1892. Bd. XII, pag. 824 e 846.

WIGURA. *Ueber Quantität und Qualität der Mikrobien auf der menschlichen Haut.* Wratsch., 1895,. 14.

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

Contributo allo studio della reazione delle ghiandole linfatiche nelle infezioni acute e croniche

Ricerche sperimentali del Dott. G. B. SIMONCINI.

Le ricerche finora compiute sul modo di comportarsi del sistema linfatico rispetto ai microrganismi, sono venute a dimostrare che i gangli linfatici, sparsi per tutto l'organismo, compiono a favore di questo una missione difensiva della più alta importanza, mediante un triplice meccanismo d'azione (*filtrante*, *attenuante* ed *immunizzante*) (1).

Mancava però, fino a poco tempo addietro, qualsiasi conoscenza sulle modificazioni che avvengono nell'intima struttura del ganglio, sotto l'influenza dei germi infettanti. Si comprende come tali cognizioni siano importanti per poter intendere il meccanismo della difesa gangliare.

I soli Bezançon e Labbè (2) nel 1898 cercarono di rilevare con uno studio istologico molto accurato, in che modo si svolga la reazione dei gangli linfatici in diverse infezioni ed intossicazioni e vennero alla conclusione che l'arrivo dei batteri patogeni o delle loro tossine nei gangli, provoca da parte di questi una reazione, la quale, istologicamente, è contrassegnata da forte congestione vasale, seguita da diapedesi e comparsa di leucociti polinucleari, da

(1) V. per un riassunto generale di tali ricerche: L. Manfredi, *Sulla importanza del sistema gangliare linfatico nella dottrina moderna dell'infezione e dell'immunità* nel « Giorn. internaz. delle scienze mediche » 1898; oppure « Virchows Archiv » 155 Band, 1899; o « Lavori dell'Istituto d'Igiene di Palermo ». Vol. IV, 1899.

(2) *Etude sur le mode de réaction et le role des ganglions lymphatiques dans les infections expérimentales*. Arch. de Médec. expérim. et d'anat. pathol. 1898, Tome X, pag. 318.

iperplasia cellulare nei follicoli e da ipertrofia del connettino reticolare.

I citati autori però si sono solamente occupati di alcune infezioni acute, e d'altra parte hanno inoculato sempre dosi di virus letali, scegliendo come via d'inoculazione la sottocutanea e la endovenosa.

Per quanto riguarda le infezioni croniche, le nostre conoscenze rimanevano sempre oscure e confuse; solo molto recentemente il prof. Manfredi nel suo lavoro « *I gangli linfatici nella difesa dello organismo contro la tubercolosi* » (1), si è occupato, però in modo piuttosto sommario dal lato istologico, della reazione che si osserva nei gangli linfatici in seguito alle inoculazioni endolinfatiche con dosi minime di coltura tubercolare ed è giunto alla conclusione che:

« Il sistema gangliare linfatico esplica, nel conflitto con i bacilli tubercolari, una reazione a difesa propria e dell'organismo, la quale comprende i seguenti fattori finora accertati:

« *a*) un meccanismo che arresta o ritarda la progressione ulteriore dei bacilli nel corpo, e che è dovuto in parte alla naturale struttura del ganglio, e in parte all'effetto meccanico dipendente dai processi infiammatori che sorgono nel tessuto gangliare sotto l'influenza dei bacilli stessi;

« *b*) un'influenza attenuatrice della loro virulenza e lentamente germicida;

« *c*) una cospicua tendenza in particolare alla fibrificazione del tessuto specificamente leso, e in generale alla sclerosi parziale o totale della ghiandola infetta ».

Per completare le nostre conoscenze sull'argomento, ho, per consiglio del prof. Manfredi, intrapreso uno studio sistematico sulle alterazioni istologiche che presentano i gangli linfatici:

1° nelle *infezioni acute*, praticando inoculazioni intralinfatiche con dosi di virus *letali* e non *letali* (massime e minime);

2° nelle *infezioni croniche*, inoculando dosi di virus *addirittura minime*, in modo da riprodurre, per quanto fosse possibile, le condizioni naturali dell'infezione;

3° nelle *intossicazioni acute* e *croniche* di origine batterica, servendomi anche qui d'inoculazioni intralinfatiche con dosi *letali e non letali* (2).

(1) Atti della R. Accademia di scienze mediche di Palermo, 1902. Palermo — Il Policlinico, sezione chirurg., 1902, Roma.

(2) Quest'ultima parte forma il tema d'un nuovo lavoro di prossima pubblicazione.

I. Ricerche sul carbonchio.

Abbiamo voluto studiare l'infezione carbonchiosa, come quella che rappresenta il prototipo delle infezioni acute, sia per la rapidità del suo svolgimento, che per l'imponenza dei fenomeni che la accompagnano.

Tecnica. — La via prescelta per l'inoculazione era sempre la *camera anteriore dell'occhio* ed il materiale d'inoculazione era costituito da culture virulentissime di carbonchio in brodo (1), tenute per 48 ore a 37 C. e rese omogenee, previa filtrazione attraverso comune carta da filtro sterilizzata.

La tecnica adoperata per l'inoculazione è stata quella usata nel laboratorio (cocainizzazione e temporanea lussazione del bulbo fuori dell'orbita, lavaggio della superficie, infissione nella cornea di un sottile ago da iniezione, fuoruscita dell'umore acqueo e inoculazione della cultura mercè apposita pipetta di 1 cc. divisa al centesimo).

Dopo di essermi assicurato mercè ripetuti saggi che la *dose letale minima* di cultura era per la camera anteriore dell'occhio delle cavie (i soli animali adoperati per l'esperienza) di 1/40 di cc., intrapresi le seguenti 3 serie di ricerche:

Prima Serie: Inoculazione di dose *minima non letale* (1/150 di cc. di cultura).

Seconda Serie: Inoculazione di dose *massima non letale* (1/50 di cc. di cultura).

Terza Serie: Inoculazione di dose *letale* (1/30 di cc. di cultura).

Ogni serie comprendeva un lotto di 7 animali, i quali venivano inoculati nello stesso giorno e nella stessa ora (6 per la camera anteriore, 1 come controllo per la via sottocutanea). Indi si procedeva, mercè dissanguamento, all'uccisione in serie degli animali inoculati per la camera anteriore, di 24 in 24 ore fino al 5° giorno per quelli inoculati con dosi non letali (il 6° si lasciava quale controllo e lo si uccideva dopo 15 giorni) e con lo stesso ordine fino alla morte, la quale non andava al di là del 4° giorno, per quelli inoculati con dosi letali.

Così facendo ci era dato di potere studiare le alterazioni istologiche dei gangli nelle divere fasi e secondo il diverso esito (guarigione o morte) dell'infezione.

I gangli carotidei, prelevati subito dopo l'uccisione degli animali, venivano fissati per 24 ore in alcool assoluto, tenuti per 12 ore in xilolo e poi inclusi in paraffina.

La colorazione delle sezioni, incollate sui vetrini con l'albumina glicerinata di Meyer, veniva fatta col litio carminio per le ricerche istologiche, col metodo di Gram-Nicolle per le batteriologiche.

---

(1) Le cavie, inoculate per la via sottocutanea con 1/150 di cc. di cultura in brodo di 48 ore a 37 C., muoiono in 36 ore circa.

Per la dimostrazione delle figure cariocinetiche ho adoperato come liquidi fissatori la miscela osmio-cromo-acetica di Flemming e la soluzione acquosa satura di sublimato; come soluzioni coloranti, la safranina per i pezzi fissati nella miscela di Flemming; la soluzione consigliata da Biondi-Heidenhain (orange, fuxina acida, verde di metile) per quelli fissati in sublimato.

Prima Serie.

Gangli carotidei di cavie inoculate per la camera anteriore con dose minima non letale.

Dopo 24 ore dall'inoculazione. — A debole ingrandimento si nota anzitutto un maggiore accumolo di leucociti, i quali sono in rapporto ad una dilatazione vascolare della glandola stessa, vascolarizzazione dimostrata dalla maggiore evidenza di numerosi vasi e capillari, nei quali l'endotelio è in necrosi ed attorno ai quali esiste qua e là qualche stravaso.

L'infiltrazione leucocitica, sensibile nei varii seni e follicoli linfatici, sembra sia maggiore nella parte corticale, nella quale gli elementi e di infiltrazione e linfoidi costituiscono un ammasso assai compatto, che si presenta con un bordo più colorato rispetto alla rimanente sezione della glandola. Gli elementi linfoidi sono in preda a gravi alterazioni, difatti non è possibile coi più forti ingrandimenti dimostrare un corpo cellulare; è scomparso il contorno protoplasmatico e si ha completa assenza di nucleo e di reticolo cromatico, l'elemento linfoide apparendo come un corpuscolo irregolare, uniformemente e fortemente colorato dal carminio, ciò che corrisponde alle note della *cromatolisi*.

Di leucociti ve ne ha alcuni ben costituiti con reticolo cromatico appariscente e protoplasma granuloso ben colorabile, ve ne sono altri i quali assumono così pallidamente la tinta da far pensare che siano già colpiti dal processo infettivo. Non pertanto si può affermare che molti di questi leucociti sono attivi e vitali, e di ciò si ha prova e nella fisiologica costituzione dell'elemento e nel fatto che molti di questi si vedono inglobare elementi in distruzione e granuli di pigmento ematico tolti a questi stravasi, già rilevati attorno ai vasi sanguigni. Mai si è visto l'endotelio dei capillari sanguigni pigliar parte al processo di fagocitosi: si è invece notato che esso è in buona parte scomparso ed i rari nuclei che ancora persistono sono in preda a necrosi da coagulazione.

In ordine alla ricerca dei bacilli del carbonchio col metodo Gram-Nicolle non si riesce a dimostrarne la presenza. Si vede invece che molti leucociti tra cui alcuni mono- e polinucleari sono forniti di granuli e detritus granulari colorati in violetto, granuli e detritus che si riscontrano anche nell'endotelio dei vasi sanguigni.

Fra questi granuli tinti in violetto se ne scorge talora alcuno che ricorda lontanamente la forma del bacillo del carbonchio senza che si possa peraltro affermare ciò in modo assoluto; in massima parte però essi sono molto irregolari di grandezza e di forma.

La disposizione che questi granuli assumono nell'interno del leucocito è varia, ora mostrandosi raggruppati alla periferia, ora ai due poli, ora

sparsi nel protoplasma, ora nel nucleo dove si rilevano spesso abbondanti, ora come un alone di granuli tutto intorno al bordo libero del corpuscolo. Analoga disposizione si può rilevare per gli endotelii dei seni linfatici.

Tutti questi caratteri faceano sospettare che si potesse trattare di una frammentazione della sostanza nucleare, dipendente forse da processi attivissimi di divisione diretta o indiretta del nucleo.

Per accertarci di ciò abbiamo voluto ricorrere all'esame dei gangli fissati nella miscela osmio-cromo-acetica di Flemming e in sublimato e colorati con la safranina.

Dall'esame dei diversi preparati abbiamo constatato quanto segue:

Numerose figure di scissione diretta degli elementi linfoidi; figure di scissione diretta e di cariocinesi negli endotelii vasali proliferanti.

Inoltre cellule rigonfie, a contorni non ben delineati alla periferia delle quali notansi numerosissimi granuli, intensamente colorati. Evidentemente trattasi qui di processi un po' avanzati di degenerazione granulosa.

Accanto a queste cellule esistono altre forme che si devono considerare come figure cariocinetiche, sebbene non si possano riferire a tipi ben netti. Si vedono infatti cellule allungate, scolorate, il cui contorno è appena visibile e ai poli d'esse si osservano delle piccole masse intensamente colorate che nell'insieme dànno l'idea delle cellule che hanno completato la loro evoluzione di scissione indiretta ed i cui nuclei entrano nella fase di riposo (gomitolo).

Queste cellule presentano l'aspetto di quelle che Duval classifica sotto l'indicazione di stadi *y*.

Dall'osservazione fatta risulta quindi che quei granuli, tingibili col Gram, non rappresentano del tutto granuli e detriti bacillari, ma in gran parte sono anse cromatiche, in parte granuli d'involuzione del protoplasma, in parte nuclei giovani dipendenti dalla tumultuosa ricostituzione del parenchina glandulare.

E difatti sappiamo che i nuclei in cariocinesi e gli elementi giovani si colorano col Gram.

In complesso quindi già dopo 24 ore la glandula ha risentito l'azione dell'infezione carbonchiosa, la quale tende a necrosare l'elemento linfoide e ad estendere i fatti distruttivi, alterando la morfologia e la funzionalità del ganglio. Però accanto a questi processi distruttivi notiamo che la ghiandula reagisce contro l'invasione del virus con una febbrile moltiplicazione dei suoi elementi.

Dopo 48 ore dall'inoculazione. — A debole ingrandimento già si nota che la morfologia della glandula è profondamente alterata. A forte ingrandimento si vedono persistere i fatti accennati precedentemente: ancora più intensa è la vascolarizzazione, persistono tracce degli antichi stravasi, enorme è poi l'accumulo dei leucociti, divenuti talmente fitti da mascherare quasi completamente gli altri particolari istologici. I centri germinali sono completamente scomparsi, ed è impossibile distinguere più la configurazione dei follicoli.

È da osservare inoltre che dentro i vasi sanguigni dilatati si ha un

grande accumulo di globuli rossi che li ostruisce. Inotre in questo periodo è meno accentuato che nel primo il rigonfiamento del reticolo ganglionare.

Colla colorazione alla Gram si rileva sempre la presenza di quei granuli già descritti nei preparati del periodo precedente, e con la colorazione con la safranina dei pezzi fissati in Flemming ed in sublimato si viene altresì a constatare che anche qui la massima parte di quei granuli sono da riferirsi agli stessi processi di cariocinesi, di scissione diretta e di degenerazione granulosa, già precedentemente descritti.

Dopo 3 giorni dall'inoculazione. — Notansi qui delle zone costituite da veri focolai di necrosi nei quali sono abbondanti i frammenti degli elementi in distruzione. Riesce qui difficile il dimostrare le tracce di quegli stravasi accennati precedentemente.

Colla colorazione alla Gram notansi i soliti granuli tinti in violetto; con l'osservazione dei pezzi fissati in Flemming o sublimato e colorati con safranina gli stessi fatti notati precedentemente. Dippiù si nota che dei leucociti che contengono questi granuli molti sono morti, difatti in essi ogni struttura di nucleo e di reticolo è perduta; non assumono più la colorazione e si presentano invece chiari e rifrangenti, note tutte che attestano la loro perduta vitalità.

Dopo 4 giorni dall'inoculazione. — Qui si nota forte accumulo di leucociti, trombosi vasale e per la prima volta una proliferazione abbastanza sensibile del connettivo. Colla colorazione alla Gram e col metodo di Flemming si rilevano sempre, sebbene in minor numero, i soliti granuli colorati rispettivamente in violetto ed in rosso assai intensamente e piuttosto scarsi anche i leucociti necrotici.

Dopo 5 giorni dall'inoculazione. — Pur rimanendo essenzialmente gli stessi i fatti descritti nei preparati di 4 giorni, riesce qui più facile osservare la proliferazione del connettivo, il quale si immette sotto forma di elementi giovani stellati fra i gruppi di leucociti.

Con la colorazione alla Gram e con la safranina si rilevano sempre più scarsi i soliti granuli tinti rispettivamente in violetto ed in rosso intenso.

Riassumendo i fatti constatati nei preparati di questa prima serie, si può stabilire che le inoculazioni intralinfatiche di dosi *minime non letali* di virus carbonchioso determinano nei gangli delle cavie gravi alterazioni morfologiche.

Al primo urto cogli agenti infettivi gli elementi linfoidi perdono la loro vitalità e cadono prontamente in necrosi. A questo fatto si accompagna la congestione vasale, la vasodilatazione dei capillari linfatici, i quali si affrettano a versare falangi di leucociti in soccorso del punto minacciato, e la tempestosa e febbrile moltiplicazione degli elementi propri del ganglio (scissione diretta ed indiretta).

La lotta pare quindi in un 1° tempo sostenuta dai leucociti sia accorsi sia neoformati *in loco* e parzialmente anche dall'endotelio dei seni linfatici; in un 2° tempo anche dal connettivo dei medesimi.

L'attività dei leucociti è enorme: ne abbiamo la prova nella successiva scomparsa dello stravaso e di quegli elementi linfoidi necrotici che notammo nei preparati dei primi giorni.

Anche molti dei corpuscoli bianchi accorsi cadono in necrosi; ma i nuovi elementi che continuamente li sostituiscono rendono viva e duratura la lotta: essi finiscono col sostituirsi, per così dire, quasi interamente agli elementi essenziali del ganglio.

Quanto ai bacilli del carbonchio, noi non ne abbiamo rilevato nessuna forma caratteristica nei nostri preparati, e quindi bisogna ammettere che essi soccombano già nelle prime 24 ore. È questo, dunque, un vero e proprio processo di autoguarigione per opera dei gangli.

Che sia così lo dimostra il fatto che l'animale di questa serie, lasciato quale controllo, è rimasto in vita, mentre quello inoculato per la via sottocutanea soccombette all'infezione carbonchiosa già dopo 36 ore circa.

Seconda Serie.

Gangli carotidei di cavie inoculate con dose massima non letale.

Dopo 24 ore dall'inoculazione. — Enorme è l'infiltrazione dei leucociti, enorme il rigonfiamento del reticolo linfatico, impossibile più la delimitazione dei seni: in necrosi quasi tutti gli elementi linfoidi ed anche parecchi leucociti, accentuatissima la congestione vasale e numerose le emorragie perivasali. Si nota altresì un leggiero grado di degenerazione granulosa degli elementi.

Colla colorazione Gram-Nicolle si notano abbondanti granuli, tinti in violetto, che occupano come al solito, il corpo ed il nucleo dei leucociti. Colla safranina si notano poi i fatti già notati nella 1ª serie (cariocinesi, scissione diretta) ma molto più accentuati.

Dopo 48 ore dall'inoculazione. — La glandula è ridotta essenzialmente ad un tessuto quasi uniforme, riccamente vascolarizzato. Gli elementi sono in preda a degenerazione granulosa non solo, ma molti si presentano anche idropici, rigonfi, scolorati e rifrangenti.

Pure in mezzo a quest'enorme distruzione tre fatti colpiscono e fanno fede della forza di resistenza del ganglio:

a) la tumultuosa ricostituzione degli elementi linfatici;

b) l'accorrere, specialmente dalla periferia del ganglio, di numerosi leucociti giovani in soccorso di quelle cellule bianche che hanno dovuto soccombere nella lotta;

c) l'essere alquanto diminuito l'edema del reticolo linfatico.

Inoltre rilevasi che gli stravasi sono ancora abbastanza sensibili e che già in questo periodo appare una proliferazione dell'elemento connettivale.

L'osservazione dei preparati fissati in Flemming e sublimato e colorati

colla safranina mostrano che i processi di carfocinesi e di scissione diretta sono anche qui molto accentuati e più specialmente nella zona corticale avvengono a spese dell'elemento linfoide e del connettivo che è proliferante.

Colla colorazione alla Gram notansi i soliti granuli, colorati in violetto.

Dopo 3 giorni dall'inoculazione. — L'intera glandula sembra trasformata in un accumulo di leucociti ed è più accentuato il processo di proliferazione connettivale; per tutt'altro i fatti sono perfettamente identici a quelli descritti precedentemente.

Anche qui granuli come sopra, tingibili in violetto col Gram e in rosso intenso colla safranina.

Dopo 4 giorni dall'inoculazione. — Fatti analoghi a quelli descritti nei precedenti preparati.

Degna di nota la circostanza che colla doppia colorazione si nota più scarsa la quantità dei granuli nei globuli bianchi, sparsi su tutta la superficie della sezione; abbondante invece nei leucociti che trovansi alla periferia, leucociti che sono qui più numerosi che in qualunque altro punto ed in attiva proliferazione.

Dopo 5 giorni dall'inoculazione. — Infiltramento parvicellulare nella sostanza corticale, midollare e nella capsula connettivale, la quale si presenta un po' ingrossata per imbibizione sierosa; stravasi non tanto diffusi bene rilevabili nella zona sottocapsulare; necrosi dei vasi e specialmente delle arterie di medio calibro e desquamazione dell'endotelio. Proliferazione del tessuto connettivo capsulare, da cui si partono delle gittate che invadono tutta la sostanza propria della ghiandola.

I soliti granuli, sebbene in minor numero, tingibili in violetto col Gram, in rosso intenso colla safranina.

Dopo 15 giorni dall'inoculazione. — I limiti della sostanza corticale e midollare sono abbastanza confusi. Si nota forte infiltramento dei follicoli e cordoni linfatici, dilatazione dei seni linfatici, proliferazione degli endotelii vasali, ed intensa proliferazione del connettivo stromatico.

La capsula si presenta anch'essa ispessita e manda forti e numerosissime gittate di connettivo proliferante nella sostanza corticale.

A forte ingrandimento si nota degenerazione cromatolitica dei nuclei di molti elementi, specialmente dei leucociti mononucleati grossi, ed attiva proliferazione dei linfociti.

Alla periferia si nota una miriade di elementi giovani i quali spiccano per la loro intensa colorazione colla safranina.

Colla colorazione alla Gram-Nicolle si osservano scarsissimi granuli e detritus, tinti in violetto, sparsi di qua e di là per tutto il campo e relativamente più numerosi nella zona corticale.

Volendo riepilogare i risultati di questa 2ª serie non si può che confermare quanto già si disse per la 1ª.

Due fatti debbono essere messi maggiormente qui in evidenza; la proliferazione degli elementi proprii della glandula (elementi linfoidi) e la proliferazione del connettivo stromatico.

Questi fatti sono molto più accentuati in quest'ultima serie e con molta probabilità sono essi strettamente legati al processo di guarigione.

Terza Serie.

GANGLI CAROTIDEI DI CAVIE INOCULATE CON DOSE LETALE.

Dopo 24 ore dall'inoculazione. — Qui la necrosi regna sovrana: essa ha distrutto quasi interamente la parte centrale del ganglio, la quale non presenta che elementi linfoidi morti, frammenti di elementi cellulari, granuli fortemente colorati e leucociti morti a nucleo spezzettato.

La necrosi degli elementi passa per tutte le descritte forme della cromatolisi; si vedono cellule irregolari quali fortemente ed uniformemente colorate, quali frammentate e sempre alterate nella forma e nella dimensione. Per distruzione di varie cellule vicine, frammenti di antiche cellule possono aggregarsi dando l'aspetto di masse amo.fe, confuse e debolmente colorate. In altri casi la cellula è in preda ad una vera vacuolizzazione.

Da questo punto si può per una serie di forme intermedie giungere fino a detritus granulare largamente sparso in tutto il preparato.

La stessa trafila di forme degenerative seguono i leucociti, i quali accorrono dai numerosi vasi congestionati o per rottura dei medesimi e conseguente stravaso o attraverso le pareti di essi.

In altri casi, avvenuta la morte dell'elemento, questo s'imbeve rapidamente di liquidi interstiziali e diventa idropico.

Si hanno insomma le modalità iper- ed ipo- cromatica della cromatolisi.

Il processo distruttivo degli elementi impegna qui talvolta delle intere zone di tessuto. Questo allora non assume più alcuna colorazione e fa contrasto, per la sua tinta chiara, con numerose legioni di cellule bianche che si affollano attorno agli spazii morti. Si è detto che verso la parte centrale del preparato era ben visibile e dimostrabile la estesa necrosi degli elementi; ora analogamente a quanto accade per gli spazii morti centrali, accade per tutto il ganglio, dalla periferia del quale si vedono fittissimi leucociti stringersi attorno alla parte centrale che sembra la più maltrattata dal processo infettivo.

Nei preparati colla colorazione alla Gram e colla safranina si nota che parallelamente all'enorme accumolo di leucociti esiste in questi la presenza di granuli che, tinti rispettivamente in violetto ed in rosso intenso, fanno solo in piccola parte sospettare un'origine batterica, mentre rappresentano l'effetto di un attivissimo processo di divisione del nucleo o prevalentemente l'effetto di una involuzione del protoplasma cellulare.

Dopo 48 ore dall'inoculazione. — Notasi più estesa la distruzione di tutti gli elementi. I frammenti di questi elementi in distruzione appaiono in ogni punto delle varie sezioni nelle quali si notano abbondanti stravasi sanguigni, che si presentano a preferenza negli strati sottocorticali del ganglio.

Tutto qui è estesa necrosi ed i riflessi di una effimera vitalità sono appena mantenuti dalla presenza dei leucociti, i quali in parte saranno accorsi dai vasi, le cui tuniche si presentano ispessite per fatti di proliferazione e di infiltrazione, in massima parte sono devuti ad intensi processi di neoformazione.

Colla doppia colorazione vedonsi persistere sempre le note della distruzione o l'abbondanza di granuli, la cui origine è stata più volte descritta.

Anche qui gli elementi ricchi in granuli ed i granuli stessi liberi sono specialmente numerosi nella parte periferica sottocorticale del ganglio.

Dopo 3 giorni dall'inoculazione. — Gli elementi si colorano assai debolmente e sono trasformati in masse ialine dove non è più possibile la differenziazione di essi.

Colla doppia colorazione, grazie al contrasto delle tinte, i particolari istologici riescono più apprezzabili.

Molto sensibile è il numero dei leucociti caduti in necrosi, sebbene non possa negarsi che molti di essi sono ancora vitali.

Anche qui i soliti granuli, tingibili in violetto col Gram ed in rossò intenso colla safranina; sono maggiormente addensati alla parte corticale del ganglio.

Dopo 4 giorni dall'inoculazione (cioè dopo la morte dell'animale). — Necrosi estese, trombosi vasali e stravasi sanguigni contrassegnano quest'ultimo periodo.

Colla doppia colorazione, in mezzo agli ultimi leucociti che, ricchi ancora di granuli colorati, occupano il campo del microscopio, si constata ora per la prima volta la presenza di un grandissimo numero di bacilli del carbonchio, in tutta la pienezza dei loro caratteri morfologici.

Dai fatti osservati in quest'ultima serie di esperienze, si deduce che quando i bacilli del carbonchio investono in gran numero la ghiandola linfatica, essi determinano subito processi necrotici più o meno estesi, vincono la barriera gangliare e, passando nel sangue, producono l'infezione generale.

Il ganglio però, anche in questo caso, reagisce e si difende energicamente fino all'ultimo, prima di soccombere. Difatti, oltre il continuo accorrere e il continuo moltiplicarsi (processi cariocinetici e scissioni dirette) di leucociti nuovi rimpiazzanti quelli che vengono via via distrutti, s'impone il fatto, rilevato anche in questa terza serie come nelle due precedenti, che cioè nel ganglio non si trovano bacilli del carbonchio già dopo 24 ore dall'inoculazione, nè nei giorni consecutivi fino al terzo, mentre cioè si svolge l'infezione generale ma soltanto si vedono i soliti granuli, tingibili col Gram, ad alcuni dei quali è da attribuire un'origine batterica; l'invasione dei bacilli nel ganglio non avviene che alla fine, cioè poco tempo prima della morte dell'animale. Ciò significa evidentemente che il ganglio, pur quando sia sopraffatto da un numero eccessivo di bacilli carbonchiosi, e non possa quindi impedirne la diffusione nell'organismo, conserva però la proprieta di lottare contro i bacilli che in esso rimangono e che arrivano successivamente dal sangue, distruggendoli; esso non perde tale proprietà che in ultimo quando l'organismo tutto è sopraffatto, nelle ore che precedono la morte.

Rimaneva intanto ad indagare con maggore esattezza la sorte dei bacilli del carbonchio, i quali non poterono mai essere rilevati nella lunga serie di preparati, salvo il caso di morte dell'animale.

Per far luce su tale fatto, ci parve opportuno di completare lo studio dei gangli, procedendo all'esame di essi nel periodo anteriore alle 24 ore.

Abbiamo a tale scopo intrapreso una nuova serie di ricerche e inoculato nella camera anteriore dell'occhio di 3 gruppi di cavie rispettivamente 1/150, 1/50 e 1/30 di cc. di coltura in brodo di carbonchio; uccisi poi gli animali dopo 2 e dopo 8 ore dall'inoculazione, abbiamo anche qui sottoposto ad esame isto-batteriologico i relativi gangli carotidei.

Essendo le alterazioni istologiche dello stesso tipo, tuttochè di vario grado, nei preparati di tutte e tre le serie, per brevità le riassumiamo in unico capitolo.

Dopo 2 ore dall'inoculazione. — Si nota una forte congestione dei vasi con più o meno estesi focolai emorragici, e microciti carichi di pigmento ocraceo.

Colla doppia colorazione si nota la presenza di qualche rarissimo bacillo del carbonchio e di scarsi leucociti contenenti qualche raro granulo colorato in violetto.

Dopo 8 ore dall'inoculazione. — Istologicamente fatti identici dei preparati precedenti, per quanto più accentuati.

Colla colorazione alla Gram notansi scarsi bacilli carbonchiosi nei preparati delle prime due serie, più numerosi in quelli dell'ultima serie. Questi bacilli si mostrano però morfologicamente alterati; di fatti alcuni sono contorti, altri leggermente flessuosi, ora parzialmente decolorati e granulosi, ora nettamente frammentati. Oltre ai bacilli trovansi anche, per quanto scarsissimi, frammenti bacillari, granuli e detritus, tinti sempre in violetto, nell'interno dei leucociti.

È dunque evidente che i bacilli del carbonchio appaiono nel ganglio nelle prime ore consecutive all'inoculazione e che molto probabilmente sono già del tutto distrutti alle 24 ore.

Riassumendo ora quanto è stato fin qui descritto, diremo che il processo reattivo del ganglio verso i bacilli del carbonchio si svolge nel modo seguente:

Pervenuti i bacilli del carbonchio nel ganglio per la via dei linfatici, determinano in un primo tempo gravi alterazioni (congestione vasale, stravasi sanguigni, necrosi degli elementi linfoidi e di alcuni leucociti accorsi, e necrosi di intere zone di tessuto); contemporaneamente i bacilli vengono disgregati, e ridotti in forma di granuli e detritus; sono poi i leucociti che si affrettano a detergere

dagli stravasi sanguigni e dagli elementi morti il ganglio minacciato. Accanto però a questi processi distruttivi si nota una febbrile moltiplicazione degli elementi proprii del ganglio (cariocinesi, scissione diretta).

In un secondo tempo o le energie latenti organiche del ganglio si risvegliano, riparando al danno avvenuto (proliferazione del connettivo, reazione degli endotelii linfatici) e l'infezione è vinta come nelle due prime serie; o il ganglio impotente a porre argine contro il virus, dopo aver lottato fino all'ultimo, non può riparare alle sue perdite (nessuna reazione del connettivo e dell'endotelio, necrosi estesa dei leucociti) e finisce per essere travolto nell'infezione generale dell'organismo.

Evidentemente la diversità di risultato fra le prime due e l'ultima serie nel caso nostro dipende dalla diversa quantità di virus inoculato, ma si comprenderà facilmente che i risultati possono essere suscettibili di variazioni a seconda la virulenza della cultura e poi a seconda l'età, il peso e le condizioni dell'animale.

I processi reattivi sono gli stessi per le prime due serie, e per l'ultima s'accordano, salvo lievi varianti, dovute alla diversa via tenuta per l'inoculazione, con quanto Bezançon e Labbé hanno così accuratamente descritto.

II. Ricerche sulla tubercolosi.

La tubercolosi ci è sembrata fra le infezioni croniche quella che meglio d'ogni altra potesse fornirci dei dati importanti per lo scopo delle nostre indagini, poichè il bacillo tubercolare predilige, come sappiamo, le vie linfatiche e soggiorna per lo più a lungo nell'organismo mantenendosi spesso in istato di latenza assoluta.

Ed invero gli studii di Loomis (1), di Spengler (2), di Pizzini (3) e di Kàlble (4), Babes, Mueller, Neumann, Volland (5) sono venuti

---

(1) *Researches of the Loomis laboratory*. Vol. I, 1890.

(2) *Zur Bronchialdrusentubercolose der Kinder*. « Zeitsch. f. Hygiene, u. Infektion skr » XIII, 1893.

(3) V. Comunicazione del prof. Forlanini al Congresso di medicina interna. Roma, 1901.

(4) *Unters. über den Keimgehalt normaler Bronchiallymphdrüsen* in « Münch. medic. Wochenschrift » N. 19, 9 mai 1899.

(5) « Zeitsch. f. Klin. Med. » Bd. XXIII.

a dimostrare che in moltissimi individui morti per altre malattie, che non sia la tubercolosi, si possono riscontrare glandule bronchiali ed anche cervicali contenenti bacilli tubercolari vivi e virulenti, e le quali talvolta neppure all'esame microscopico lasciano rilevare alcuna alterazione istologica apprezzabile; confermandosi in tal modo anche per il b. della tubercolosi quanto è stato dimostrato dal Perez, cioè la possibilità del *microbismo latente nei gangli linfatici* (1).

Dimostrato dunque che bacilli tubercolari possono trovarsi nei gangli linfatici, interessava indagare sperimentalmente in che modo questi gangli reagiscono allo stimolo determinato dall'introduzione di *dosi addirittura minime* di virus tubercolare.

Giova ripetere che noi ci occupiamo qui di tale reazione solo dal punto di vista istologico; per tutt'altro si consulti il lavoro già citato di Manfredi e Frisco.

Tecnica. — In tutte le nostre esperienze ci siamo serviti di una coltura in agar glicerinato di bacilli tubercolari, abbastanza virulenta, la quale inoculata per la via sottocutanea persino alla dose di 0.00001 mg. uccideva le cavie in un periodo di 40 giorni circa.

Come animali da esperimento abbiamo adoperato conigli e cavie; come via di inoculazione abbiamo prescelto la camera anteriore dell'occhio e la vagina, appunto per limitare la penetrazione del virus alle sole vie linfatiche.

Il materiale che doveva servire per le inoculazioni veniva costantemente pesato ad una bilancia di precisione e poi emulsionato accuratamente in un mortaio d'agata con una quantità determinata di soluzione cloruro-sodica al 0.6 %; mediante ulteriore diluizione con la stessa soluzione, si regolava poi il frazionamento del materiale.

Per le nostre esperienze adoperammo 4 lotti di 7 animali ciascuno (2 lotti di conigli e 2 di cavie); ciascun lotto veniva inoculato nello stesso giorno e nella stessa ora (6 per la camera anteriore o per la vagina ed 1 come controllo per la via sottocutanea). Indi, mercè dissanguamento, si procedeva all'uccisione in serie degli animali, inoculati per la via linfatica dopo 2, 8, 20, 40, 90 giorni dall'inoculazione (il 7° rimaneva come controllo).

La dose di cultura inoculata fu per:

Conigli	Camera anteriore occhio. . . .	0.001	mg.
	Vagina	0.1	»
Cavie	Camera anteriore	0.00001	mg.
	Vagina	0.001	»

I gangli carotidei dello stesso lato dell'inoculazione, estirpati subito dopo

(1) *Parassitismo microbico latente nei gangli linfatici normali* — Questi Annali, Roma, vol. VIII, 1897; ovvero « Lavori dell'Istituto d'Igiene di Palermo », vol. III, 1898.

l'uccisione dell'animale, venivano fissati parte in alcool, parte in soluzione satura di sublimato.

Le sezioni incollate sui vetrini con l'albumina glicerinata di Mayer venivano colorate quali con carminio litico, quali con ematossilina.

Per la ricerca dei bacilli tubercolari nelle sezioni dei gangli ci siamo serviti del metodo consigliato da D'Arrigo Stampacchia (1).

Comportamento degli animali inoculati per la via endolinfatica. — Negli occhi degli animali inoculati per la via della camera anteriore non si ebbero fenomeni degni di nota, ad accezione di un lieve intorbidamento della cornea, specialmente nei primi giorni.

Nei giorni consecutivi gli animali cominciano a diminuire di peso ed a perdere in parte il pelo: in seguito però il trofismo generale si rialza, gli animali ripigliano e superano perfino il peso primitivo e rimettono il pelo.

I gangli carotidei dello stesso lato dell'inoculazione si vanno lentamente tumefacendo; e questa tumefazione, che è più evidente nelle cavie, raggiunge il suo massimo verso il 30°-40° giorno, dalla quale epoca essi tendono sempre più a ridursi di volume, mentre che si fanno più duri.

Gli animali inoculati per la via linfatica uccisi in serie non presentarono all'autopsia alterazione alcuna nè segno alcuno di tubercolosi in nessun organo; ad eccezione soltanto del lieve ingrossamento dei gangli carotidei o inguinali.

Gli animali inoculati per la via lintatica e lasciati come controllo sopravvissero tutti; mentre quelli inoculati per la via sottocutanea morirono per tubercolosi diffusa.

Prima Serie.

Esperienze sui conigli.

A) *Gangli carotidei di conigli inoculati con 0.001 mg. di coltura tubercolare per la via della camera anteriore dell'occhio.*

Dopo 2 giorni dall'inoculazione. — Le sezioni del ganglio esaminate a debole ingrandimento non presentano gravi alterazioni, lasciano però scorgere una vascolarizzazione, la quale si accompagna ad una lieve infiltrazione parvicellulare tutt'attorno ai vasi medesimi che sono anche aumentati di calibro, in special modo le vene.

Questi particolari appaiono meglio con i forti ingrandimenti, a mezzo dei quali si riesce anche a stabilire un certo grado di dilatazione dei seni linfatici.

(1) Centr. f. Balt. n. 23, 1898, pag. 123.

In questi e nei follicoli si nota anzi un maggior accumulo di elementi linfatici, e di questi taluno presenta le note della cromatolisi (nucleo fortemente colorato con forme prevalentemente a biscotti e a semilune).

In complesso adunque si ha il primo stadio d'un processo reattivo con fenomeni di congestione, stasi venosa, maggiore accumolo di elementi linfoidi, necrosi di qualcuno di tali elementi.

Dopo 8 giorni dall'inoculazione. — A debole ingrandimento si nota una estesa vascolarizzazione della glandola tutta, assai più accentuata però nella parte corticale, la quale presenta un forte accumolo di elementi linfoidi ben costituiti e che nulla presentano di anormale, salvo la cromatolisi di qualche nucleo, ciò che si rileva meglio con più forte ingrandimento.

Nella parte midollare si ha una dilatazione dei seni linfatici, ma gli elementi linfatici di questa parte non sono equabilmente distribuiti, presentano invece zone di intensa rarefazione.

Parallelamente a questi fatti decorrono fenomenti di reazione del tessuto proprio dei seni linfatici. Questi fenomeni si compendiano in una proliferazione del tessuto di rivestimento senza che per altro si giunga alla formazione di vere e proprie cellule endotelioidi. Un altro fatto degno di essere rilevato è che in mezzo agli elementi propri della glandola si vedono a questo punto apparire dei grossi leucociti polinucleati.

Nella parte midollare è molto più estesa che non nella corticale la cromatolisi dei nuclei linfoidi, quasichè il primo reagire della sostanza midollare all'infezione sia rappresentato da fatti necrotici che hanno i loro fenomeni reattivi nella proliferazione delle cellule di rivestimento dei seni.

Questi sono tutt'attorno circondati da un accumolo di elementi linfatici e da vasi congesti. A questi fenomeni non corrisponde reazione alcuna della capsula esterna, nè della sostanza corticale.

Dopo 20 giorni dall'inoculazione. — A debole ingrandimento si nota che la glandola ha subito una fittissima infiltrazione, specialmente a carico della sezione dell'ilo; nella parte midollare è scomparsa la struttura dei seni linfatici per una uniforme, sebbene non intensa, quantità di linfociti che maschera i seni ed i follicoli linfatici. A forte ingrandimento si osservano, in mezzo alle travate di linfociti, delle piccole zone costituite da una grossa cellula centrale polinucleata, circondata tutt'attorno da un alone che non prende più il colore e che è cinto alla periferia da un accumolo più fitto di leucociti. Contemporaneamente attorno a questa zona si nota del connettivo giovane che sotto forma di cellule stellate o ramificate si avanza dal tessuto ambiente dei seni linfatici e si affretta a stringere da ogni parte gli scarsi tubercoli iniziali.

Nella zona peritubercolare sono evidentissimi i fenomeni di distruzione delle cellule preesistenti, fenomeni che possono del resto osservarsi in grande quantità anche a carico degli elementi linfoidi della rimanente glandula.

A fortissimo ingrandimento si nota che alcuni vasi capillari della glandula sono trombosati per un processo di endoarterite obliterante. Restano invece pervii alcuni vasi venosi che si mostrano anzi dilatati.

Per la prima volta si rileva una certa infiltrazione della capsula della glandula, la quale si mostra inspessita.

Esaminando varie sezioni si è potuto in qualcuna notare l'esistenza di zone di necrosi degli elementi propri della glandula, nelle quali cioè gli elementi sono in distruzione o almeno non assumono più la colorazione.

La mancanza dei caratteri del detritus tubercolare farebbe dubitare che si tratti qui di una vera necrosi caseosa; però la quasi completa decolorazione degli elementi cellulari parla per un processo necrobiotico degli elementi, abbastanza progredito. Ai limiti di questa zona necrobiotica vi ha spesso reazione connettivale. L'esame portato anche sui vasi afferenti della glandula ha fatto constatare che nulla presentano di particolare, all'infuori di una leggera arterite proliferante.

Dopo 40 giorni dall'inoculazione. — A debole ingrandimento la glandola presenta nella sostanza corticale degenerazione vacuolare. Però se si esamina con ingrandimento più forte si vede che non tutti i vacuoli osservati sono dovuti a fatti distruttivi, ma nella maggioranza sono spazii linfatici ectasici, vasi capillari anche essi dilatati, piccole arterie e vene con parete infiltrata ed endotelio desquamato e necrotico.

A piccolo ingrandimento in alcuni vacuoli si nota un tessuto reticolato formato da trabecole finissime che dà l'idea d'una sezione di glandola sottoposta allo spennellamento. Inoltre qua e là si osservano delle gittate di tessuto connettivo fibrillare, il quale osservato per tutto il campo della sezione, si vede prendere origine dal connettivo sottocapsulare e venire a formare nella sostanza corticale delle travate che rammentano quelle che si osservano nei casi di splenite interstiziale. Queste travate hanno nuclei allungati e sostanza protoplasmatica assolutamente decolorata: l'essere però i nuclei scarsi e piccoli parla in favore di un connettivo che entra nella fase cirrotica. In tutta la sezione della glandula si nota uno scarso numero di tubercoli, però poco appariscenti per le alterazioni involutive assai avanzate che presentano.

Nella sostanza corticale esiste un certo grado di necrosi che assume in qualche punto l'aspetto della degenerazione ialina.

Accanto alle alterazioni degli endotelii dei vasi linfatici in alcuni punti si può constatare la proliferazione degli endotelii dei vasi sanguigni.

La capsula della glandola è fortemente ispessita, in alcuni punti il connettivo che la costituisce ha subito la trasformazione sclerotica, in altri il connettivo è giovane, infiltrato di elementi parvicellulari; da questa capsula, come si disse, si partono delle propaggini che si internano nella sostanza corticale.

La sostanza midollare non è differenziata dalla corticale.

A forte ingrandimento si nota trombosi vasale nella sostanza corticale, qualche tubercolo circondato da un intenso infiltramento di elementi linfoidi e connettivo fibrillare.

In alcuni punti si notano vasi linfatici il cui lume è completamente ingombro di elementi epitelioidi in degenerazione ialina e la parete vasale si mostra fortemente infiltrata.

La polpa glandolare in alcuni punti si presenta non alterata, in altri mostra le note di una degenerazione ipocromatica. È poi assai spiccata la proliferazione del connettivo basamentale della glandola, che si rileva nei punti dove la polpa della glandola è più rarefatta.

In queste sezioni si osservano oltre agli elementi proprii delle glandole (linfotici), numerosi i leucociti mononucleari a grosso nucleo; non è raro però il caso di osservare anche dei polinucleari.

Dopo 90 giorni dall'inoculazione. — A piccolo ingrandimento si nota che tutta la sezione ha un aspetto uniforme, ricca di elementi linfatici e cir-

condata dalla capsula ispessita ed infiltrata. Però sul colore roseo uniforme del fondo spiccano delle piccole zone rotonde ed irregolarmente sferiche colorate più intensamente del tessuto circostante e che risultano formate di cellule linfoidi. Con più forti ingrandimenti si illustra meglio il processo.

Si tratta qui certamente di antichi tubercoli in sostituzione connettivale come del resto vedemmo cominciare ad avverarsi nei preparati in quarantesima giornata.

I particolari del processo vengono meglio mostrati colla immersione omogenea.

Risulta allora che accanto a zone costituite *in toto* da elementi connettivali ne esistono altre che di connettivo hanno solo la periferia, mentre al centro il nodulo è costituito da leucociti. In altri casi il centro di questi noduli non assume più colore, senza che per questo si possa parlare di sostanza caseosa, non arrivandosi alla fusione del tessuto.

In tali casi in questi punti incolori si osserva detritus di cellule distrutte, ancora colorate, ed accanto a queste alcuni elementi grossi rifrangenti, vescicolari e che non assumono più colore, degli elementi in una parola colpiti da degenerazione fisaloide.

Ci pare chiaro pertanto che le varie forme descritte non sieno che stadii diversi di uno stesso processo. Vedemmo nei preparati precedenti il connettivo di proliferazione addensarsi tutto attorno ai tubercoli di cui la maggior parte restano, per così dire, allo stato embrionale, senza mai raggiungere la caseificazione. Questo connettivo dapprima circoscrive il tubercolo in formazione e mentre i leucociti ne distruggono gli elementi, il connettivo stesso seguita a proliferare ed immette tralci di elementi giovani nel tessuto neoformato, cui si sostituisce, riducendo quello che è la prima manifestazione di un tubercolo ad un ammasso di connettivo giovane.

S'intende perciò che il trovare l'area occupata primitivamente da un tubercolo, divisa in 2 o 3 lobuli per mezzo di tessuto connettivo proliferato, non rappresenta che una modalità del processo di cicatrizzazione, val quanto dire del processo di guarigione.

Si deve anche qui ripetere quanto fu detto per i preparati in 20ª e 40ª giornata, che esiste cioè una enorme sproporzione tra i poteri di riparazione ed il processo infettante, risultando chiaro da quanto si è esposto che il processo tubercolare nei gangli di conigli inoculati per la via della camera anteriore dell'occhio si può considerare esaurito al 90° giorno.

B) *Gangli inguinali di conigli inoculati per la via della vagina con 0. 1 mgr. di coltura tubercolare.*

Dopo 2 giorni dall'inoculazione. — L'esame a piccolo ingrandimento non mostra alcuna alterazione nè nella forma, nè nel volume della glandola.

Gli elementi linfoidi, diffusi nella sezione, non presentano alterazione.

La sostanza corticale e midollare appaiono fisiologiche, nè modificazione alcuna si rileva a carico della capsula involgente ed in ordine alla vascolarizzazione.

Con più forte ingrandimento si confermano tutti i dati già cennati; si

rileva solo maggiore accumulo degli elementi linfoidi in corrispondenza dell'ilo glandolare.

Dopo 8 giorni dall'inoculazione. — Notasi leggero aumento del tessuto proprio della glandola, leggera infiltrazione attorno ai vasi, che si mostrano dilatati, e proliferazione degli endotelii vasali.

Dopo 20 giorni dall'inoculazione. — Esistono a questo periodo lievi lesioni a carico dei vasi e della sostanza corticale della glandola. In questa si nota maggiore l'accumolo degli elementi linfatici, in modo che l'individualità dei follicoli in molti punti scompare; e maggiore turgidezza dei follicoli residuali.

Nella sostanza midollare si nota poi maggiore rarefazione delle colonne midollari, proliferazione del connettivo citogeno sotto forma di elementi stellati ramificati e proliferazione degli endotelii degli spazi linfatici.

I seni linfatici sono ben visibili, ben differenziati, ben colorabili e senza traccia di degenerazione nucleare gli elementi linfoidi.

In ordine ai vasi infine si rilevano fenomeni d'arterite.

Dopo 40 giorni dall'inoculazione. — Intensa è la degenerazione vacuolare, ancora più intensa la ialinizzazione degli elementi. Anche qui si ha proliferazione del connettivo capsulare con le caratteristiche già dette a proposito dei preparati in 40ª giornata della precedente serie.

I tubercoli sono scarsissimi e qualcuno è in fase fibrosa.

Molte cellule endoteliali sono sparse nella sostanza corticale, mentre si trova anche qualche cellula gigante isolata.

Il tessuto citogeno è in attiva proliferazione fibrosa ed assume un aspetto che si avvicina molto al connettivo di cicatrice.

Nella sostanza corticale in alcuni punti si trova necrosi del parenchima glandolare. Questa sostanza necrotica si presenta leggermente granulosa con colorazione diffusa, senza che sia possibile differenziare alcun elemento anatomico. Nei punti periferici di essa si nota un'enorme proliferazione del connettivo ed infiltramento parvicellulare.

La sostanza midollare non è punto differenziata dalla corticale. Anche qui si hanno punti necrotici i quali si presentano circondati da zone molto vaste di connettivo fibroso. In alcuni punti si notano zone di ghiandola normale.

Dopo 90 giorni dall'inoculazione. — Qui si nota che le sezioni dei gangli si mostrano normali in alcuni punti, mentre in altri presentano le stimmati del processo superato, stimmati che sono rappresentate da eccessivo aumento del connettivo capsulare e basamentale e da un certo grado di addensamento dei leucociti.

Da quanto è stato fin qui osservato risulta anzitutto che, nei conigli, mentre le inoculazioni per la via della vagina, sebbene praticate con dosi di gran lunga maggiori, non determinano che pochi fatti importanti, quelle praticate per la via della camera anteriore dell'occhio con dosi minime, danno effetti oltremodo apprezzabili; fatto del resto ben naturale ove si pensi che mentre nel caso dell'inoculazione per la via della vagina, l'assorbimento avviene a mucosa integra, nell'altro caso tutto il materiale inoculato viene com-

pletamente e facilmente utilizzato. Ciò premesso è facile intendere i risultati ottenuti.

Il virus tubercolare determina (per la ragione sopradetta), nei gangli inguinali un maggiore accumolo di linfociti e raramente la formazione di qualche tubercolo, che in ogni caso non arriva mai alla completa costituzione, venendo rapidamente incluso e distrutto dal connettivo; nei gangli carotidei invece il virus induce le alterazioni tipiche precedentemente esposte; ma in questo caso l'infezione non raggiunge mai il quadro classico che mostra nell'uomo e nella cavia.

La serie dei preparati mostra in modo inconfutabile che nulla è alterato nel processo di evoluzione della tubercolosi gangliare dei conigli; essa si svolge come nell'uomo e nella cavia, però è soffocata, si può proprio dire, sin dal suo inizio, dalla proliferazione del connettivo ambiente.

E forse è a questo fatto principalmente dovuta la minore recettività del coniglio alla tubercolosi; rimanendo soltanto il dubbio se il connettivo di questo animale abbia in generale maggiore attività di quello di altri animali o se sia più facilmente sensibile all'azione del virus tubercolare.

Nella descrizione delle alterazioni subìte dai gangli si è accennato qua e là a fenomeni di necrosi degli elementi ed a fatti di arterite; alterazioni ben naturali ove si pensi che in tutte le infezioni i fenomeni della cromatolisi sono la logica conseguenza della azione del virus e che l'endoarterite tubercolare è oramai uno dei reperti più frequenti nella tubercolosi.

Seconda Serie.

Esperienze sulle cavie.

A) *Gangli carotidei di cavie inoculate per la via della camera anteriore dell'occhio con 0.00001 mg. di coltura tubercolare.*

Dopo 2 giorni dall'inoculazione. — A debole ingrandimento si osserva un forte addensamento di linfociti nella sostanza corticale. Tanto questa che la midollare, della quale è impossibile dimostrare la trama di sostegno, sono sede di un'intensa congestione vasale.

In uno dei preparati si è potuto anzi vedere una trombosi vasale, attorno a cui si addensano già i leucociti ed un accumolo maggiore di elementi linfoidi nel ganglio che da un lato si addensano nella corticale, dall'altro mascherano completamente la struttura del reticolo, riuscendo così impossibile differenziare follicoli e seni linfatici.

Con ingrandimenti più forti si può stabilire che molti di quegli elementi che si sono affollati nella trama di sostegno, della glandola, sono necrotici ed in preda ad una vera fisalizzazione.

È molto interessante il fatto che piccole zonule di elementi necrotici, in cui questi si sono frammentati in un detritus amorfo, granuloso, rifrangente ed incoloro, tutt'attorno limitato da uno strato di leucociti stipati, appaiono già nei preparati microscopici, simulando così l'aspetto di un tubercolo in istato di avanzato disfacimento.

Tutto ciò dimostra l'energica azione del virus tubercolare sugli elementi linfatici delle cavie.

A questo periodo è già sensibile un certo aumento di volume della glandula, che si congiunge ad un infiltramento e rigonfiamento della capsula esterna.

Dopo 8 giorni dall'inoculazione. — La vascolarizzazione del ganglio assume ben più marcate proporzioni. Parallelamente a questo fatto un altro ne decorre di non minore importanza ed è la grande distruzione degli elementi linfatici.

Questa distruzione fa sì che intere zone restano prive di elementi e non lasciano scorgere che la sola trama di sostegno. Ciò specialmente nella sostanza midollare, perchè la corticale mantiene ancora degli elementi linfoidi, che però presentano anche essi in buona parte note di distruzione.

Ricchissima anche è la infiltrazione leucocitaria e parecchi leucociti migrati sono anche essi colpiti da necrosi.

In questo periodo però non tutte le sezioni presentano l'aspetto descritto.

Altre hanno invece un colore uniforme, contengono ancora molti elementi e non hanno l'aspetto reticolato delle precedenti; altre infine presentano, fatto degno di nota, questo duplice aspetto; lo che dimostrerebbe che la azione del virus tubercolare non è ugualmente intensa in tutti i casi ed in tutti i punti di una stessa glandola.

Coi più forti ingrandimenti si mettono in evidenza scarsi tubercoli i quali si presentano costituiti da una zona di infiltramento. In qualche punto si nota anche una zona di caseificazione, circondata da elementi epitelioidi.

Però contrariamente a quanto accadeva pei conigli, il tubercolo pare si svolga qui con straordinaria rapidità se a questo periodo noi non troviamo più cellula gigante centrale, ma sostanza caseosa.

Questi fatti si accompagnano come sempre a proliferazione della trama di sostegno e ad arterite e possono riscontrarsi non solamente nelle zone di necrosi degli elementi linfatici, ma anche in quei punti che sono solo allo stato d'infiltrazione.

Vi sono poi casi in cui il tubercolo non è caseificato ed è invece rappresentato da un vero tubercolo tipico; ma anche qui si tratta di diversa intensità dello stesso processo.

Dopo 20 giorni dall'inoculazione. — A debole ingrandimento si nota infiltramento leucocitario nel parenchima. In molti punti i follicoli della corticale sono distinti; ma nella maggioranza delle parti il tessuto corticale si mostra ammassato ed uniformemente colorato. Si nota in esso degenerazione vacuolare ed in alcuni punti spazii linfatici molto grandi ripieni di endotelio proliferante.

Le piccole vene sono alterate per processi di endo- e mesoflebite; pre-

dominano però sempre i fatti proliferanti. Nelle piccole arterie si nota degenerazione ialina di tutte e tre le tuniche, ma ciò non si osserva in tutti i punti, perchè nella maggior parte dei casi le arterie sono in preda a processi di arterite proliferante.

La sostanza corticale non è ben distinta dalla midollare, però ancora si conserva una certa distinzione tra l'una e l'altra, anzi nella sostanza midollare i fatti di proliferazione del connettivo citogeno sono più pronunziati.

La capsula è infiltrata, proliferante, e da essa si partono delle gittate che man mano s'insinuano nella sostanza propria della glandola, però non assumono mai la forma di vere e proprie travate.

A forte ingrandimento si notano scarsi tubercoli, la maggior parte dei quali caseificati, e molti spazi, probabilmente antichi tubercoli, tramezzati da elementi connettivali ramificati ed assumenti tutte le parvenze di un delicato reticolo. In molti punti della glandola, specie nella sostanza corticale, si ha degenerazione ialina.

Dopo 40 giorni dall'inoculazione. — A debole ingrandimento manca la netta differenziazione tra sostanza corticale e midollare. Si nota dilatazione delle arterie e vene, mentre gli spazi linfatici sono mascherati dall'enorme accumulo di linfociti. Si nota un discreto numero di tubercoli, già in caseificazione, mentre tutt'attorno di essi e con ingrandimenti più forti si nota un alone formato da ricca infiltrazione parvicellulare ed abbondante produzione di connettivo.

La capsula si mostra ispessita e proliferante come anche il connettivo citogeno. Sono anche manifeste grandi quantità di leucociti, a prevalenza i grossi mononucleari, quantunque se ne vedano anche di polinucleari. Anche qui si ha endo- e meso-arterite.

Dopo 90 giorni dall'inoculazione. — Ispessimento considerevole della capsula, proliferazione del connettivo citogeno, scarse tracce di tubercoli, sostituiti quasi per intero da tessuto connettivo o aventi al centro solo qualche punto assai limitato di sostanza caseosa.

La struttura della glandola è qui perduta; le alterazioni vasali sono identiche a quelle già descritte precedentemente.

Il processo tubercolare in alcuni punti è stato completamente vinto, in altri lo sarà tra pochi giorni.

B) *Gangli inguinali di cavie inoculate per la via della vagina con 0.001 mgr. di cultura tubercolare.*

Dopo 2 giorni dall'inoculazione. — A debole ingrandimento non si nota alcuna alterazione. I gangli mostrano un aspetto del tutto fisiologico e questo giudizio è confermato dall'osservazione a forte ingrandimento.

Dopo 8 giorni dall'inoculazione. — Vaso-dilatazione molto intensa con notevole accumulo di leucociti tra gli elementi linfatici, fittamente stipati e nella corticale e nella midollare.

La struttura fisiologica del ganglio viene così ad essere alterata per essere sostituita da un tessuto di aspetto uniforme, nel quale però, special-

mente con i forti ingrandimenti, si possono ancora differenziare i seni linfatici ed i follicoli.

Un fatto degno qui di nota è l'arterite proliferante dei vasi, la quale va di pari passo colla morte di un certo numero di elementi linfoidi, i quali mal colorandosi, fanno buon contrasto all'osservazione microscopica con gli elementi ancora integri che si colorano vivamente.

Il fatto che pòi qui colpisce è l'accumulo di linfociti, la necrosi di alcuni di essi ed i fenomeni di reazione vasale, che sempre accompagnano questi fatti.

Dopo 20 giorni dall'inoculazione. — A debole ingrandimento notasi infiltramento parvicellulare nel connettivo periglandolare con proliferazione degli elementi fissi dello stesso, e discreto numero di cellule endoteliali.

Nella sostanza corticale si ha degenerazione ialina già abbastanza spiccata, però ancora è possibile distinguere i follicoli: gli spazi linfatici si mostrano più dilatati con accumoli di linfociti.

A forte ingrandimento si nota proliferazione del connettivo citogeno per lo più sotto forma di cellule stellate ed un certo grado di necrosi degli elementi, infiltrazione di leucociti, specie di quelli a grosso nucleo distinto, processi di endoarterite proliferante, tubercoli scarsi, non ancora caseificati.

In complesso a questo periodo predominano i fatti necrotici e la proliferazione del connettivo citogeno e capsulare.

Dopo 40 giorni dall'inoculazione. — La glandola è tutta trasformata in un ammasso di connettivo, in parte sclerotico, in parte proliferante, con avanzatissimo infiltramento parvicellulare in molti punti di essa.

Nel mezzo della glandola in un punto, che topograficamente deve corrispondere alla sostanza midollare, si osserva una grande lacuna, a margini frangiati, frastagliati ed infiltrati. Tutti i vasi hanno le pareti fortemente infiltrate e gli endotelii in parte distrutti, in parte desquamati.

Nella capsula e al disotto di essa si notano stravasi sanguigni, vasi sanguigni fortemente dilatati, tessuto connettivo proliferante.

In molte arterie e vene si notano fatti di flebite ed arterite intensa, anzi nelle arterie non è raro osservare la retrazione della lamina elastica interna, in modo da dare l'impressione di una superficie ondulata.

In alcuni vasi si nota desquamazione e nello stesso tempo proliferazione dell'endotelio, sicchè il lume del vaso a causa dell'ispessimento della tunica interna si presenta molto ristretto.

Con ingrandimento più forte si conferma il già detto e si nota inoltre la presenza di tubercoli in scarsissima quantità. Nella maggior parte di questi manca la cellula gigante e nel centro, cioè nel punto che da questa dovrebbe essere occupato, si nota un'ombra incolore, ciò che fa pensare che in quel punto è cominciata la degenerazione caseosa.

Lo strato epiteliale è fortemente ispessito per infiltramento di elementi granulosi disposti in una trama connettivale molto fitta.

Si nota ancora enorme proliferazione del connettivo capsulare e citogeno, che circonda in fitta barriera la lacuna notata al centro della glandola con debole ingrandimento e che non è altro che tessuto in degenerazione caseosa. Si tratta in questo caso di tubercoli confluenti che vengono stretti dal tessuto connettivo circostante.

Dopo 90 giorni dall'inoculazione. — Non v'è più differenziazione tra sostanza corticale e midollare: nè le sezioni hanno più l'aspetto di tessuto

ghiandolare linfatico perchè trasformate in un ammasso considerevole di connettivo sclerosato. Si ha inoltre enorme infiltramento parvicellulare diffuso per tutto il parenchima glandulare.

Qua e là vi sono punti in degenerazione caseosa, circondati da tessuto connettivo reticolato. La capsula è molto inspessita con gittate che si portano nel parenchima glandolare. Le alterazioni vasali sono identiche a quelle descritte nei precedenti preparati.

Riassumendo diremo che il virus tubercolare, inoculato nelle cavie per le vie endolinfatiche, attacca con grande intensità gli elementi del ganglio, specie se inoculato per la via della camera anteriore dell'occhio. I primi fatti che caratterizzano il processo sono la necrosi degli elementi linfatici, e la intensa vascolarizzazione del ganglio. In un secondo tempo si assiste all'evoluzione del tubercolo primitivo che raggiunge qui la struttura tipica e che si svolge con straordinaria rapidità. Anche qui però, allorchè il numero dei bacilli invadenti è minimo, il processo è strozzato dalla proliferazione connettivale che invade la glandola da ogni parte.

Abbiamo tralasciato di descrivere dettagliatamente le alterazioni subite dai bacilli tubercolari perchè esse sono quasi identiche per tutte e due le serie; diremo solo qui che la colorazione specifica ci ha sempre, specie nei primi giorni (2 e 8), fatto constatare la presenza di scarsi bacilli tubercolari morfologicamente ben conservati, in parte liberi e in maggior parte inclusi in grosse cellule mononucleari.

In un periodo più avanzato (20 giorni) si assiste all' involuzione dei bacilli; al 40° giorno sono sparutissimi di numero e si presentano sotto forma di frammenti o granuli tingibili sempre colla colorazione specifica. In un periodo più avanzato (90 giorni) tanto i frammenti quanto le granulazioni possono dirsi quasi completamente scomparsi.

***

Riassumiamo i risultati delle ricerche sulla tubercolosi, facendoli seguire da alcune brevi considerazioni:

1° La penetrazione dei bacilli tubercolari nelle ghiandole linfatiche può avvenire tanto per la camera anteriore dell' occhio quanto per la mucosa integra della vagina. In quest'ultimo caso i bacilli penetrano più lentamente ed in minore quantità;

2° Le inoculazioni endolinfatiche di quantità minime di bacilli tubercolari determinano e nelle cavie e nei conigli una infezione tubercolare localizzata nelle sole ghiandole linfatiche; però, mentre

nelle cavie si arriva ad avere la costituzione tipica del tubercolo, ed anche non di rado la caseificazione di esso, nei conigli invece il tubercolo si arresta nelle sue fasi primordiali, senza dar luogo nè alla formazione di cellule giganti, nè alla produzione di pus;

3° L'infezione è vinta, nei conigli più prontamente ed energicamente che nelle cavie, dalla reazione del parenchima gangliare. Questa si manifesta, in primo tempo, con la iperproduzione degli elementi linfatici proprii del ganglio, i linfociti, che si addensano in maggior numero verso i punti che saranno sede di tubercoli, ed inoltre con l'affluenza verso i medesimi punti dei leucociti migrati dai vasi sanguigni, e con la consecutiva comparsa nel ganglio delle grosse cellule mono- e polinucleari. La conseguenza di questa prima fase del conflitto fra bacilli e tessuto gangliare. è la formazione del tubercolo a cui naturalmente contribuiscono anche gli elementi fissi della ghiandola. Interviene però, più o meno presto, una seconda fase: la reazione di questi elementi, del tessuto di sostegno del ganglio, sotto forma di proliferazione e neoformazione del connettivo ghiandolare che gradatamente circoscrive, incista, e finalmente invade i focolai tubercolari; e così, mentre il processo infettivo si spegne lentamente, con la fibrificazione del tessuto leso, la ghiandola provvede definitivamente alla propria guarigione.

È bene però notare che il processo di guarigione è subordinato a due fattori:

a) Al numero dei bacilli che perviene nella glandula e dei focolai tubercolari che si formano in essa;

b) Alla maggiore o minore e più o meno rapida proliferazione del connettivo.

Per quanto riguarda il primo fattore è naturale che se nella glandula perviene un grande numero di bacilli e si ha la formazione di numerosi od estesi focolai tubercolari i mezzi difensivi di cui essa dispone saranno insufficienti a soffocare il processo.

Che poi la proliferazione del connettivo rappresenti uno dei mezzi di difesa delle ghiandole linfatiche contro il bacillo tubercolare lo mostra anche l'andamento del processo, il quale, malgrado che l'esito finale sia unico, appare in certo modo diverso nei conigli e nelle cavie.

Nei conigli infatti, dove è rapida ed abbondante la proliferazione del connettivo, non si ha mai costituzione di tubercoli tipici nè caseificazione; nelle cavie invece, dove la proliferazione connettivale è più tarda e più scarsa, si ha e costituzione del tubercolo tipico e caseificazione.

Ora perchè questo diverso comportamento del connettivo?

Se noi ricordiamo che non solo le ghiandole linfatiche del coniglio e della cavia ma anche quelle delle diverse regioni di uno stesso animale non presentano una struttura perfettamente identica, troveremo la spiegazione di questa diversità di comportamento. In vero dal già citato lavoro di Bezançon e Labbé si rileva come, mentre nella cavia i gangli linfatici sono poveri di tessuto connettivo e di centri germinativi, l'uno e gli altri sono assai più abbondanti nel coniglio ed abbondantissimi poi nel gatto, che come si sa è molto resistente alle malattie infettive.

E, riferendoci alla tubercolosi delle ghiandole linfatiche dell'uomo, è anche in questi fatti che noi troviamo la spiegazione della maggiore frequenza di essa nei bambini e della facile caseificazione in questo primo periodo della vita; mentre è un caso eccezionale trovarla oltre i 60 anni (Kocher); appunto perchè il connettivo delle ghiandole linfatiche, molto scarso nei bambini, va sempre più rendendosi abbondante col crescere dell'età, fino a che nella vecchiaia si ha una sclerosi fisiologica della ghiandola che per le ragioni già dette si oppone allo sviluppo dei processi tubercolari.

Sembrerebbe infine a prima vista che i risultati delle nostre ricerche sieno contrarii a quanto ha osservato Kälble; che cioè dei bacilli tubercolari possono trovarsi nei gangli linfatici di individui sani, senza che i gangli presentino neppure all'esame microscopico alcuna alterazione istologica.

Relativamente a ciò è da fare osservare che per quanto piccola sia stata la quantità di bacilli inoculati, non si saranno forse perfettamente riprodotte le condizioni naturali dell'infezione, senza dire poi che i bacilli provenienti da culture artificiali, che si adoperano per esperienze, sono presumibilmente più virulenti di quelli che si trovano allo stato naturale esposti a diverse cause di attenuazione.

Ora se con le dosi da noi adoperate i gangli hanno potuto reagire in maniera tale da impedire quasi la formazione del tubercolo e da aver ragione dell'infezione, nessuna meraviglia che la penetrazione di scarsissimi bacilli non troppo virulenti nei gangli (così come avviene nelle condizioni naturali) possa alle volte non determinare in essi alcuna alterazione apprezzabile (1).

---

(1) Per la tecnica delle ricerche sulla tubercolosi mi è stata utile la cooperazione intelligente e solerte del laureando Giovanni Profeta.

Istituto d'Igiene della Università di Palermo

Sul valore protettivo degli endotelii rispetto ai microrganismi

Ricerche sperimentali del Dott. **GIOVANNI DI CRISTINA.**

È stato studiato accuratamente il valore protettivo della pelle e delle mucose e dalle ricerche fatte in proposito risulta che tanto l'una che le altre esercitano un discreto ufficio di protezione rispetto ai microrganismi. Non è stato studiato in modo esauriente il comportamento degli endoteli (sierose, vasi) nelle infezioni. Questi, essendo sopratutto tessuti di rivestimento, hanno una grande analogia coi tessuti anzidetti. È giustificata quindi la domanda: hanno valore protettivo gli endotelii?

Nella casuistica di traumatologia sono riportati fatti, i quali mostrano chiaramente che anche senza l'intervento dell'arte i feriti con eviscerazione o con soluzione di continuo delle pareti intestinali, abbandonati alle sole forze della natura, possono guarire. Non è qui il caso di riportare le singole osservazioni registrate in tutti i trattati di chirurgia. Dirò solo che perfino i vecchi chirurghi riportarono successi splendidi in casi di lesioni del peritoneo e in epoche in cui non si conosceva l'asepsi e l'antisepsi. Basta citare Prassagora, Ruggero di Salerno, Rolando, Fallopio, i cui nomi sono legati alle pagine più gloriose della storia della chirurgia addominale.

Da ciò si può certamente assurgere all'idea che il peritoneo è dotato di un forte potere protettivo. Non si arriva però a trovare una ragione plausibile che ci permetta di spiegare il meccanismo di questo fatto nel modo il più naturale possibile.

Così si può invocare un'azione protettiva meccanica, come per tanto tempo si è ammessa per la pelle. Ma le cellule endoteliali non formano un tutto continuo, lasciano qua e là lacune, dette *stomi*, in cui non c'è rivestimento endoteliale. Si protrebbe pensare al potere antibatterico della linfa, ma le ricerche del Pagano hanno

dimostrato che la linfa non esercita alcuna azione deleteria sui batteri.

È stata invocata anche la fagocitosi, che viene esercitata dalle cellule endoteliali e dai leucociti. Per osservare la fagocitosi, come dirò in seguito, bisogna mettersi in condizioni di esperienze un po' artificiali, per cui questa ipotesi lascia anch'essa dei gravi dubbi.

Quando iniziai le mie richerche, non esistevano lavori diretti ad indagare il meccanismo dell'azione protettiva dell'endotelio peritoneale. Si conoscevano solo alcune indagini fatte dall'Auché e dallo Chavannaz, le quali dimostrano che il peritoneo e la pleura in confronto colla sierosa cranica resistono di più alle infezioni.

Nello scorso luglio è stata comunicata alla Società di Biologia di Parigi, una serie di ricerche dal Vidal, dal Ravaut e dal Dopter, i quali hanno ammesso che le cellule endoteliali ringiovanite in seguito al processo infiammatorio, esercitano un'attiva fagocitosi. Però contro queste conclusioni esistono diversi fatti che fanno sorgere dubbi sull'interpretazione data dai sopradetti autori.

Infatti il Banti ha constatato che il peritoneo è capace di distruggere i batteri che si trovano sempre liberi e giammai contenuti negli endoteli o nei leucociti.

Il Pfeiffer ha potuto constatare che, malgrado il lungo soggiorno nel cavo peritoneale di cavie vaccinate, il bacillo del colera non si trova mai nell'interno dei fagociti, sebbene subisca gravi alterazioni. A queste ricerche il Metchhnikoff oppone ricerche nuove colle quali cerca di conciliare le osservazioni del Pfeiffer colle sue dottrine. Infatti ammette che in primo tempo i fagociti subiscono un processo di dissoluzione, mettendo in libertà sostanze a potere antibatterico. Nondimeno la fagolisi del Metchnikoff non è stata accettata così come la propone l'autore, e stante i numerosi dubbi che lascia, si può dire che non ha spostata la quistione della fagocitosi di molto.

Inoltre per constatare il fenomeno della fagocitosi bisogna uccidere gli animali nei primi momenti dopo l'iniezione, mentre dopo due, dopo 6, dopo 24 o 48 ore il fenomeno diventa sempre più raro, finchè non si constata più.

Si deve notare anche che per apprezzare il fenomeno è necessario usare culture fresche; sicchè, pur non volendo negare assolutamente la fagocitosi come mezzo protettivo, si deve convenire che nel peritoneo esistano altri mezzi di difesa, per spiegarci la resistenza che esso oppone ai batteri quando non si riesce a costatare una fagocitosi intensa.

Gli endoteli dei vasi e delle sierose capsulari sono stati studiati meno di quelli del peritoneo, e da ciò ch'è stato fatto non si può venire ad una conclusione sicura.

Per la sierosa articolare esistono lavori del Pawlowski, il quale ha osservato che i bacilli tubercolari innestati nella capsula articolare si diffondono rapidamente dalla cavità nelle cellule endoteliali e di là negli spazi linfatici del tessuto connettivo della tunica articolare.

Da questa osservazione isolata certamente non si può dedurre una conclusione sicura.

Riguardo agli endoteli dei vasi sono state fatte delle ricerche aventi per mira di constatare se esiste o no fagocitosi da parte delle cellule endoteliali.

Il Metchnikoff tentò di dimostrare anche per gli endoteli vasali le proprietà ammesse per i leucociti. Così ammette la semovenza di essi, perchè in seguito ad iniezioni di bacilli tubercolari si trova, specialmente nei capillari del fegato, completa desquamazione delle cellule endoteliali, che assumono un aspetto stellato, ed ammette anche la fagocitosi, perchè le cellule si trovano invase dai batteri.

Ad identiche conclusioni sono venuti Straus, Garnier, Wissokowitsch, Werigo. Non mancano però osservatori, i quali sono venuti a conclusioni diverse.

Goldscheider e R. Müller hanno visto che dopo 1′ e 15″ dall'innesto vasale i batteri si trovano nelle cellule endoteliali, ma più tardi i batteri si trovano fuori le cellule in attiva proliferazione. Le obbiezioni del Metchnikoff a queste osservazioni non sono poi così gravi da farle ritenere prive d'importanza. Infatti, se i citati autori non hanno fatto innesto nella marginale dell'orecchio del coniglio e si sono serviti d'innesti fatti nella giugulare, le condizioni d'esperimento non erano profondamente diverse e l'indebolimento delle cellule, ammesso dal Metchnikoff, è del tutto ipotetico. Se poi hanno usato culture sviluppate da molti giorni (14 giorni), la fagocitosi doveva essere più cospicua perchè i batteri erano attenuati dall'azione deleteria dei prodotti del loro ricambio organico, e su di essi i fagociti avrebbero potuto esercitare un'azione devastatrice più spiccata.

Si può obbiettare però che le particelle di proteina e di tossina inoculate assieme alla cultura ostacolino la fagocitosi. Così però si viene ad ammettere implicitamente che la fagocitosi non è poi tanto necessaria alla difesa dell'organismo contro i batteri, perchè nelle identiche condizioni di esperimento del citato autore, ma inoculando dosi minime, malgrado l'assenza della fagocitosi, i conigli sopravvivono.

Tralasciando del resto le numerose obbiezioni che si potrebbero fare, mi pare che la quistione del valore protettivo degli endoteli vasali sia stata spostata. Infatti, ricercando se esiste o no fagocitosi da parte degli endotelii, si dà alla quistione un aspetto troppo unilaterale, perchè i mezzi protettivi di cui dispone l'organismo sono molteplici e tutti ugualmente importanti. Quindi è ragionevole che in primo luogo si deve ricercare se i microrganismi possono attraversare l'endotelio vasale ed invadere i tessuti limitrofi o no, e poi, s'è possibile accertare un ufficio protettivo, indagarne il meccanismo.

Schema riassuntivo del lavoro.

Le ricerche intraprese possono raggrupparsi in tre capitoli, dei quali uno è interamente dedicato allo studio della sierosa peritoneale, il secondo riguarda gli endotelii dei vasi e l'altro compendia le ricerche fatte per la sierosa delle capsule articolari.

Sono stato spinto a studiare gli endotelii di questi tre organi, perchè oggi, contrariamente a quanto sostiene His nella sua teoria del parablasto, si devono ammettere diversi tipi di endotelii, dei quali alcuni derivano dal rivestimento primitivo del celoma, e perciò sono dei veri epitelii (endotelio pleurico, peritoneale, pericardico), gli altri derivano dalle cellule mesenchimatiche, e perciò dal punto di vista embriologico sono dei veri connettivi (endotelii delle sinoviali, dei vasi, delle borse tendinee) (Vedi Ziegler, Hertwig).

Eseguii le esperienze con batteri patogeni e con batteri banali, inoculando o culture per quanto più potevo prive di tossine e proteine, o ricche di molti prodotti del ricambio organico.

Le dosi che usai furono in principio minime, in modo che mi riusciva facile potere apprezzare la reazione degli endotelii senza che in essi si potessero costatare alterazioni d'indole degenerativa.

In seguito usavo dosi più elevate e perfino mortali, onde confrontare il modo di comportarsi degli endotelii nell'un caso e nell'altro.

Tecnica seguita.

Tecnica batteriologica. — Come batteri patogeni mi servii dello stafilococco aureo.

Di questo adoperai culture attenuate e culture rese virulenti mercè ripetuti passaggi negli animali.

Come batteri banali usai il *mesentericus fuscus* e il *prodigiosus*.

Per le piccole dosi facevo diluizioni in acqua sterile in modo da poter inoculare frazioni di ansa.

Per le dosi elevate inoculavo direttamente culture non diluite. Nel corso delle ricerche ho dovuto alterare gli endotelii della sierosa onde studiare il modo di reagire di essa alla infezione in condizioni svantaggiose di resistenza, e all'uopo mi servii della proteina del prodigioso che trovai preparata in laboratorio col metodo del Buchner. Questa proteina uccideva le cavie alla dose di un centgr., per iniezione sottocutanea o nel cavo peritoneale, con tutti i fenomeni d'una grave tossiemia.

All'esame microscopico si riscontrava necrosi diffusa dei vari endotelii.

Gli animali venivano uccisi dopo 2, dopo 24 e dopo 48 ore, e dai vari organi venivano fatti innesti in agar o in patata, secondo che gli animali erano stati trattati con mesentericus o con stafilococco.

Tecnica istologica. — Per lo studio del peritoneo e della sinoviale articolare, raccoglievo l'essudato con apposita pipetta e spalmavo i vetrini coprioggetti in modo da ottenere un tenue strato. Di questi vetrini alcuni servivano per l'esame a fresco, altri venivano trattati col metodo del Bordet (cioè fissazione per due ore in soluzione satura di acido picrico, lavaggio completo in acqua e colorazione con eosina e bleu di metilene).

Per esaminare il peritoneo eseguivo le comuni impregnazioni col nitrato di argento, in pezzetti di peritoneo fresco.

Alcuni pezzetti venivano fissati o in alcool assoluto o in soluzione acquosa di formalina al 5 % in liquido dell'Hayem. Allo stesso modo trattavo pezzetti di organi, come gangli mesenterici, fegato, milza, ecc. Questi frammenti di organi venivano colorati col carminio litico. Ho scelto la colorazione col carminio di Ort, perchè mi permetteva di praticare la ricerca dei batteri servendomi del metodo di Gram o di quello di Weigert.

PARTE I.

Sierosa peritoneale.

Serie 1ª. — Gli animali venivano uccisi progressivamente dopo 2, dopo 6 ore, ecc., tagliando il bulbo.

L'innesto dagli organi veniva fatto previo lavaggio abbondante con acqua sterile.

Innesto in peritoneo di prodigioso a dosi piccolissime.

(Un decimo di ansa di cultura su patata). (1)

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in patata dai varii organi					
			Peritoneo	Fegato	Gangli	Milza	Rene	Capsule surrenali
Cavia 1ª . .	400 gr	dopo 2 ore	+	—	—	—	—	—
Cavia 2ª . .	350 gr.	dopo 6 ore	+	—	—	—	—	—
Cavia 3ª . .	450 gr.	dopo 24 ore	+	—	—	—	—	—
Cavia 4ª . .	350 gr.	dopo 48 ore	+	—	—	—	—	—

(1) Col segno + indico lo sviluppo dei batteri, col segno — la inesistenza di esso.

Esame necroscopico delle cavie.

Nulla di notevole si osserva nelle cavie uccise dopo 2, dopo 6, dopo 24, e dopo 48 ore.

Raccolgo piccole quantità di liquido sieroso dal cavo peritoneale che in nessuna cavia supera 1/2 cmc.

Esame microscopico dell'essudato peritoneale.

È stato praticato sia con preparati a fresco sia con preparati trattati col metodo del Bordet.

Dopo 2 ore si osserva:

Numerosi leucociti polinucleati e mononucleati. Qualche cellula endoteliale desquamata con nucleo debolmente colorato.

Fagocitosi scarsa da parte dei leucociti. Numerosi batteri liberi ma deformati ed ammassati.

Dopo 6 ore si notano gli stessi fatti. Dopo 24 o 48 ore si osservano ancora gli stessi fatti, solamente colla differenza che i batteri sono più deformati.

Esame microscopico dei tessuti.

Peritoneo. — Dopo due ore nei preparati impregnati col nitrato d'argento si osserva che le cellule endoteliali hanno perduto l'aspetto a placca o la forma poligonale, assumendo una forma rotondeggiante e nello stesso tempo appaiono più piccole (cellule embrionarie). Nei preparati colorati col metodo esposto avanti, si nota leggero infiltramento parvicellulare.

Dopo sei ore gli stessi fatti molto più accentuati.

Dopo 24 e 48 ore si nota: forte infiltramento parvicellulare; ringiovanimento degli endotelii come sopra e un discreto grado di proliferazione connettiva. Non ho constatata nessuna cellula endoteliale in fagocitosi. Lo stesso si può dire per i leucociti rintracciati nel peritoneo.

Col metodo di Weigert non si mettono in evidenza che residui di batteri sempre fuori delle cellule.

Nel fegato, nella milza, nei gangli, nel pulmone non si rivelano nè alterazioni, nè batteri.

Serie 2ª. — Ho voluto ripetere con un altro batterio banale gli stessi esperimenti, per evitare l'obbiezione che i risultati ottenuti col prodigioso non potessero estendersi agli altri microorganismi banali, sapendosi che gli animali si comportano in modo diverso coi vari batteri.

Innesto in peritoneo di mesentericus fuscus a dosi piccolissime.
(Un decimo di ansa di cultura su patata).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in patata dai varii organi					
			Peritoneo	Fegato	Gangli	Milza	Rene	Capsule surrenali
1ª Cavia . .	350 gr.	dopo 2 ore	+	—	—	—	—	—
2ª Cavia . .	400 gr.	dopo 6 ore	+	—	—	—	—	—
3ª Cavia . .	300 gr.	dopo 24 ore	+ scarso	—	—	—	—	—
4ª Cavia . .	450 gr.	dopo 48 ore	—	—	—	—	—	—

Esame necroscopico.

1ª *cavia.* — Leggera iperemia nel punto d'innesto, assenza di liquido nel cavo peritoneale.

2ª *cavia.* — Iperemia del mesenterio; si può raccogliere 1/2 cmc. di essudato sieroso.

3ª *cavia.* — Gli stessi fatti di sopra; manca però l'essudato del cavo peritoneale.

4ª *cavia.* — Come la 3ª.

Esame microscopico degli essudati.

1ª *cavia.* — Manca l'essudato.

2ª *cavia.* — Numerosi globuli rossi, grande quantità di leucociti, e fra questi moltissimi linfociti.

Si osserva qualche frantume di batterio non inglobato e qualche cellula endoteliale desquamata, il cui nucleo si lascia colorare assai debolmente.

3ª *cavia.* — Assenza di essudato.

4ª *cavia.* — Idem.

Esame istologico dei tessuti.

Le osservazioni fatte per la serie precedente si possono riferire anche a questa serie.

Serie 3ª. — In questa serie ho voluto studiare il comportamento del peritoneo in seguito all'innesto di una dose considerevole di prodigioso.

Ho inoculato in peritoneo culture in brodo di prodigioso.

I risultati ottenuti li riassumo nel seguente quadro:

Inoculazione in peritoneo di alte dosi di prodigioso.

(Un quinto di cmc. di cultura in brodo).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto dai varii organi					
			Peritoneo	Fegato	Gangli	Capsule surrenali	Rene	Milza
Cavia 1ª . .	300 gr.	dopo 6 ore	+	+	+	+	+	+
Cavia 2ª .	350 gr.	dopo 12 ore	+	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

Dopo 6 ore si osserva una discreta iperemia. Nel cavo peritoneale si presentano vasi turgidi e si possono raccogliere 2 cmc. di essudato citrino. Il fegato appare ingrandito e iperemico, la milza tumida.

Dopo 12 ore si osservano i medesimi fatti, ma molto più accentuati.

Esame microscopico degli essudati.

Dopo 6 ore si osservano numerosi leucociti mono o polinucleati, e numerosi microorganismi ben conservati, anzi in attiva proliferazione. Questi batteri si mostrano sempre liberi.

Dopo 12 ore i dati sopra osservati sono più accentuati.

Esame microscopico degli organi.

Peritoneo dopo 6 ore. — Necrosi diffusa delle cellule endoteliali ma non in tutti i punti. Esse là dove la struttura non è ancora alterata, si presentano ringiovanite. È evidente anche un discreto infiltramento parvicellulare. Numerosi batteri. Negli altri organi (fegato, rene, gangli, milza) si osserva necrosi estesa degli elementi e numerosissimi batteri.

Dopo 12 ore, i fatti osservati sono accentuati.

Serie 4ª. — Alla serie precedente si poteva obbiettare che la quantità di batteri usati era eccessiva, non solo, ma che si inoculavano nello stesso tempo i prodotti del metabolismo dei batteri. Di più, che il prodigioso ha un potere tossico molto elevato, e che inoculando dosi elevate di un batterio volgare meno tossico i risultati potevano essere diversi.

Per ovviare a tutte queste obbiezioni sperimentai col mesenterico, sviluppato in patata da 12 ore, e i risultati ottenuti furono eguali a quelli ottenuti col prodigioso.

Inoculazione in peritoneo di alte dosi di mesentericus.
(Quattro anse di cultura in patata)

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in patata dai varii organi					
			Peritoneo	Sangue	Fegato	Milza	Rene	Gangli
Cavia 1ª . .	350 gr.	dopo 6 ore	+	+	+	+	+	+
Cavia 2ª . .	300 gr.	dopo 12 ore	+	+	+	+	+	+
Cavia 3ª . .	400 gr.	id.	+	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

Uguale a quello della serie precedente.

Esame microscopico degli essudati.

Idem.

Esame microscopico degli organi.

Idem.

Serie 5ª. — In questa nuova serie ho ricercato il modo di comportarsi del peritoneo alle dosi minime di batteri patogeni. I risultati ottenuti si riassumono nel quadro seguente.

Inoculazione in peritoneo di piccole dosi di stafilococco aureo.
(Tre decimi di ansa di cultura in agar).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in agar dai varii organi					
			Peritoneo	Fegato	Milza	Gangli	Rene	Capsule surrenali
Cavia 1ª . .	400 gr.	dopo 2 ore	+	—	—	—	—	—
Cavia 2ª . .	450 gr.	dopo 6 ore	+	—	—	—	—	—
Cavia 3ª . .	350 gr.	dopo 24 ore	+	—	—	—	—	—
Cavia 4ª . .	300 gr.	dopo 48 ore	+	—	—	—	—	—

Esame necroscopico.

Dopo 2 ore si osservano leggeri fatti iperemici specialmente attorno al punto d'innesto. Questi fatti sono più accentuati nella 3ª e 4ª cavia, ove potei raccogliere piccole quantità di essudati.

Esame microscopico degli essudati.

Dopo 2 e dopo 6 ore l'esame non dà alcun risultato perchè non potei raccogliere liquido essudativo.

Dopo 24 e 48 ore, sia coi preparati fatti a fresco che col metodo del Bordet, si può constatare ciò che si osserva nelle serie di animali trattati con piccole dosi di batteri banali: Cellule endoteliali desquamate con nuclei difficilmente colorabili, fagocitosi scarsa, numerosi batteri in gran parte deformati e fuori delle cellule.

Esame microscopico degli organi.

Peritoneo. — Dopo 2 e dopo 6 ore si osserva proliferazione degli endotelii i quali presentano il solito comportamento. Perdono la forma tipica dell'elemento endoteliale e pigliano l'aspetto di cellule embrionarie. Si osserva poi infiltramento parvicellulare.

I batteri fuori le cellule si presentano ammassati e deformati.

Qualche cellula si presenta gravemente alterata (degenerazione granulosa).

Dopo 24 e 48 ore i risultati dell'osservazione sono gli stessi, ma molto più accentuati.

In tutte e quattro le cavie l'esame del fegato, del rene, della milza, dei gangli non lascia rilevare nè alterazioni nè batteri.

Serie 6ª. — In questa serie ho studiato il modo di comportarsi del peritoneo negli animali inoculati con dosi letali di stafilococci.

Inoculazione di dose letale di stafilococco aureo.

(Un cmc. di cultura in brodo).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in agar dai vari organi					
			Peritoneo	Fegato	Milza	Rene	Gangli	Capsule surrenali
Cavia 1ª . .	600 gr.	dopo 6 ore	+	+	+	+	+	+
Cavia 2ª . .	450 gr.	dopo 12 ore morte	+	+	+	+	+	+
Cavia 3ª . .	350 gr.	Id.	+	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

Dopo 6 ore si osserva una leggiera peritonite. Iperemia intensa, turgore dei vasi. Liquido siero-ematico nel cavo peritoneale (3 cmc.).

Dopo 12 ore, in cui avviene la morte dell'animale, si osserva una intensa peritonite.

Il peritoneo si presenta di colore pavonazzo con punti necrotici ricoperti da essudato fibrinoso.

Dal cavo peritoneale si può raccogliere una discreta quantità di liquido siero-ematoso con fiocchi fibrinosi.

I gangli mesenterici sono tumidi e rammolliti. Nel rene sono evidenti le note della nefrite parenchimale.

Le capsule surrenali sono rigonfie e rammollite. Il fegato appare ingrandito e alla sezione lascia rilevare un'avanzata degenerazione grassa. La milza si presenta ingrandita, di colore ardesiaco, ed al taglio mostra un cospicuo aumento della polpa splenica.

Polmone edematoso. Cuore dilatato.

Esame microscopico dell'essudato.

Dopo 6 ore si osservano numerosi leucociti. Cellule endoteliali desquamate. Numerosi batteri. Fagocitosi non tanto accentuata.

Dopo 12 ore si osservano identici fatti.

Esame istologico dei tessuti.

Peritoneo. — Nella maggior parte dei preparati le cellule endoteliali sono necrotiche. La involuzione degli elementi endoteliali però, dove esistono punti sani, si osserva ancora.

Esistono alterazioni profonde degli endotelii dei vasi (desquamazione o necrosi) ed attorno ad essi forte infiltramento parvicellulare. Si constatano pochi batteri. Lo stesso fatto si osserva per la 2ª e 3ª cavia.

Negli altri organi (fegato, milza, gangli) si constatano gravi alterazioni. Nel fegato per esempio si osserva rigonfiamento torbido e necrosi diffusa degli endotelii dei vasi. Proliferazione degli epiteli dei canalicoli biliari. Infiltramento parvicellulare.

Nel rene si osservano le note di una grave nefrite parenchimale.

Questi fatti si osservano in tutte e quattro le cavie.

Serie 7ª. — In questa serie di ricerche ho cercato di vedere come si comporta colle infezioni la sierosa alterata.

Lo scopo di queste ricerche era di studiare se i batteri non molto virulenti, sottratti all'azione deleteria degli elementi endoteliali, potessero rapidamente invadere i tessuti, uccidendo l'animale.

Usai, come ho detto sopra, per alterare la sierosa, la proteina del prodigioso a dose mortale.

I risultati ottenuti li riassumo nel seguente quadro:

Inoculazione di dose non letale di stafilococco aureo in peritoneo alterato da dose letale di proteina di prodigioso.

(Proteina 1 centgr. - Stafiloc. 2 anse di cultura su agar).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in agar dai varii organi					
			Peritoneo	Fegato	Milza	Rene	Gangli	Capsule surrenali
Cavia 1ª . .	400 gr.	dopo 2 ore	+	+	+	+	+	+
Cavia 2ª . .	350 gr.	dopo 6 ore	+	+	+	+	+	+
Cavia 3ª . .	380 gr.	dopo 24 ore	+	+	+	+	+	+
Cavia 4ª . .	290 gr.	id.	+	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

Le autopsie della 1ª e 2ª cavia diedero risultati identici. Cavità peritoneale fortemente iperemica con una grande quantità di liquido siero-ematico. Vasi turgidi. Punti emorragici. Fegato tumido, fortemente iperemico e milza di colore ardesiaco, aumentata di volume e a margini smussi.

Polpa splenica aumentata.

Rene iperemico. Al taglio la zona corticale è tumida.

La capsula fibrosa si svolge facilmente. Le capsule surrenali sono iperemiche e aumentate di volume. Il polmone è edematoso.

Il cuore appare dilatato.

Nella 3ª e 4ª cavia le alterazioni constatabili macroscopicamente sono le stesse; differiscono per una maggiore intensità.

Nel fegato e nel rene si costata degenerazione grassa.

Esame microscopico dell'essudato.

Nella 1ª e 2ª cavia non si osserva nulla d'importante.

Nella 3ª e 4ª cavia si osservano: numerosi globuli rossi e leucociti mono e polinucleati. Sono evidenti anche numerosi linfonciti Scarse figure fagocitarie. I leucociti in gran parte presentano le note del rigonfiamento torbido. Numerosi stafilococci liberi.

Esame microscopico dei tessuti.

Peritoneo. — Dopo due e dopo sei ore si osserva che l'endotelio è profondamente alterato. Si vedono numerose zolle ialine, in cui non è possibile discernere elementi anatomici.

I leucociti che si osservano nel peritoneo sono gravemente alterati, presentandosi rigonfi e granulosi.

Nel fegato, nella milza, si osserva necrosi diffusa e gravi lesioni della tunica intima dei vasi sanguigni.

Lo stesso si osserva nei gangli e nelle capsule surrenali.

Nel rene si constata glomerulo-nefrite intensa con stravasi nella capsula di Bowmann.

In tutti gli organi si ha un reperto abbondantissimo di batteri.

Nella 3ª e 4ª cavia le alterazioni degli organi sono identiche.

Serie 8ª. — La dose di proteina inoculata nella serie precedente era mortale. In questa serie volli vedere ciò che sarebbe avvenuto inoculando dosi non mortali di proteina e una quantità di batteri da sè sola insufficiente ad uccidere le cavie.

Innesto di dose non letale di stafilococco aureo in peritoneo alterato da dose non letale di proteina di prodigioso.

(Proteina mezzo centgr. e un'ansa di cultura su agar di stafilococco aureo).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in agar dai varii organi					
			Peri-toneo	Fegato	Sangue	Gangli	Milza	Capsule sur-renali
Cavia 1ª . .	220 gr.	dopo 6 ore	+	+	+	+	+	+
Cavia 2ª . .	300 gr.	dopo 24 ore morte	+	+	+	+	+	+
Cavia 3ª . .	350 gr.	id.	+	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

Dopo 6 ore si osserva: Forte iperemia del cavo peritoneale con sviluppo vasale molto evidente. Essudato siero-ematico in discreta quantità (1 cmc.). Il rene, fortemente iperemico. Fegato e milza ingranditi ed iperemici. Negli altri organi si osservano fatti identici.

Dopo 12 ore si constatano gli stessi fatti, ma molto più accentuati.

In questo periodo di tempo avviene la morte dell'animale.

Esame microscopico dell'essudato.

Dopo 6 ore: Numerosi globuli rossi. Leucociti in prevalenza mononucleati grossi e linfociti. Numerosi batteri. Scarse figure fagocitarie. Non si osservano cellule endoteliali desquamate.

L'essudato delle cavie morte dopo 12 ore e dopo 16 ore presenta gli stessi fatti: qui si constatano anche cellule endoteliali fortemente alterate.

Esame microscopico degli organi.

Dopo 6 ore l'impregnazione col nitrato d'argento non avviene in tutti i punti del peritoneo, ma solo in scarse zone, ove la struttura non è profondamente modificata.

Nei preparati colorati si nota necrosi diffusa degli elementi endoteliali, che si estende alle cellule d'immigrazione.

Nella 2ª e 3ª cavia si osservano fatti uguali a quelli notati nella 1ª cavia. Negli organi della 1ª, della 2ª e 3ª cavia si osservano alterazioni necrotiche come quelle che ho descritte avanti nella serie precedente; di più si constatano numerosi batteri in attiva proliferazione.

Conclusioni della I parte.

1° L'endotelio della sierosa peritoneale in condizioni normali si oppone alla penetrazione dei germi nei tessuti dell'organismo, quando i germi non siano molto numerosi nè eccessivamente virulenti.

2° L'endotelio di detta sierosa modifica la sua struttura, assumendo il tipo embrionario, nel caso sopra cennato.

3° Inoculando dosi elevate di batteri virulentissimi si produce una intensa necrosi degli elementi endoteliali e nello stesso tempo i batteri attraversano la barriera peritoneale invadendo i tessuti ove apportano delle gravi alterazioni.

4° Se precedentemente si altera l'endotelio peritoneale con una sostanza tossica (proteine batteriche), i batteri, anche se in piccola quantità, rapidamente attraversano la sierosa è acquistano una virulenza elevata tale, che batteri provenienti da colture molto attenuate sono capaci di uccidere rapidamente gli animali.

PARTE II.

Endotelio vasale.

Serie 1ª. — Ho scelto in questa serie, come animale da esperimento il coniglio, perchè per la sua mole si prestava meglio alle ricerche non solo, ma anche per evitare l'obbiezione del Metchnikoff che l'innesto vasale fatto nella giugulare arresta la fagocitosi.

Quindi in tutti i conigli ho praticato l'innesto nella marginale dell'orecchio.

Innesto nella marginale dell'orecchio di mesentericus a dosi piccolissime.
(Un decimo di ansa di cultura su patata).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in patata dai varii organi					
			Sangue	Fegato	Rene	Milza	Gangli	Capsule sur-renali
1° Coniglio .	1050 gr.	dopo 2 ore	—	+	+	+	+	+
2° Coniglio .	1100 gr.	dopo 6 ore	—	+	+	+	+	+
3° Coniglio .	1050 gr.	dopo 24 ore	—	+	+	+	+	+
4° Coniglio .	1300 gr.	dopo 48 ore	—	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

L'esame necroscopico degli animali non mi ha dato note importanti. In tutti i conigli ho osservato fatti leggieri di iperemia.

Esame microscopico dei tessuti.

1° coniglio. — Numerose figure cariocinetiche nel fegato. Proliferazione degli epitelii dei canalicoli biliari. Infiltramento parvicellulare. Si osservano molti batteri deformati (forme di cocci) sia nel lume vasale che fuori. Nei gangli linfatici si osserva infiltramento linfoide diffuso nella sostanza corticale e midollare. Numerose figure cariocinetiche e di scissione diretta specialmente nella sostanza corticale. I batteri si osservano in piccole quantità e deformati sempre fuori le cellule.

Nella milza e nel rene si osservano uguali alterazioni. Nel 2°, 3° e 4° coniglio i fatti sono identici.

Serie 2ª. — Visti i risultati della prima serie, passai a studiare il modo di comportarsi degli endoteli vasali coi batteri patogeni.

Innesto nella marginale dell'orecchio di stafilococco aureo a dosi piccolissime.
(Un decimo di ansa di cultura su agar).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in agar dai varii organi					
			Sangue	Fegato	Milza	Rene	Gangli	Capsule sur-renali
1° Coniglio .	1050 gr.	dopo 2 ore	—	+	+	+	+	+
2° Coniglio .	1200 gr.	dopo 6 ore	—	+	+	+	+	+
3° Coniglio .	900 gr.	dopo 24 ore	+ scarso	+	+	+	+	+
4° Coniglio .	950 gr.	dopo 48 ore	id.	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

Per i quattro conigli è uguale a quello della serie precedente.

Esame microscopico.

1° *coniglio.* — Discreto numero di batteri nel fegato, liberi e fuori dei vasi. Necrosi molto accentuata dell'endotelio dei piccoli vasi. Si notano in conclusione gli stessi fatti della 1ª serie, cioè: proliferazione delle cellule epatiche, degli epiteli dei vasi biliari e infiltramento parvi-cellulare. Nel 2°, 3° e 4° coniglio si osservano identici fatti.

Serie 3ª. — Questa serie sarebbe stata del tutto oziosa, perchè se i batteri a dose refratta attraversano gli endotelii, con più forte ragione li devono superare a dose elevata.

Non pertanto ho voluto osservare se c'è differenza tra la reazione dei tessuti degli animali delle serie precedenti e quelli degli animali della presente serie.

Innesto nella marginale dell'orecchio di dose letale di stafilococco aureo.

(Un cmc. di cultura in brodo).

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in agar dai varii organi.					
			Fegato	Rene	Milza	Pulmone	Capsule surrenali	Gangli
1° Coniglio .	1000 gr.	dopo 2 ore	+	+	+	+	+	+
2° Coniglio .	1050 gr.	dopo 6 ore	+	+	+	+	+	+
3° Coniglio .	1000 gr.	dopo 12 ore morte	+	+	+	+	+	+
4° Coniglio .	900 gr.	id.	+	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

Nel 1° e 2° coniglio si osserva iperemia del fegato, che appare aumentato di volume. Nei reni si osserva nefrite parenchimale. Nella milza si nota un cospicuo aumento della polpa splenica.

Nel 3° e 4° coniglio il fegato appare disseminato di piccoli ascessi. La milza si presenta ingrandita e facilmente spappolabile. Nel rene si constata intensa nefrite parenchimale.

Esame microscopico degli organi.

Nel 1° e 2° coniglio si osserva necrosi diffusa del parenchima epatico. Gli elementi immigrati nel fegato sono in preda a grave degenerazione granulosa. Le stesse alterazioni sono evidenti nei gangli e nel rene. I batteri sono in attiva proliferazione e si trovano diffusi in tutti i punti degli organi.

Nel 3° e 4° coniglio si osservano gli stessi fatti.

Conclusioni della II parte

1° L'endotelio dei vasi non si oppone validamente alla penetrazione dei germi nell'interno dei tessuti.

2° La fagocitosi degli endotelii non si osserva che raramente e neppure essa è un mezzo valido di difesa.

3° I germi penetrati nell'interno dei tessuti determinano fatti proliferativi e ringiovanimento degli elementi anatomici, purchè non siano tanto numerosi e virulenti, perchè allora producono necrosi diffusa.

PARTE III.

Capsula articolare.

Serie 1ª. — In questa serie praticai l'innesto nella capsula articolare del ginocchio. Incisa la pelle, dopo accurata disinfezione, e messo allo scoperto il tendine prerotuleo, innestavo l'ago della siringa di Pravaz fino ad incontrare la cavità articolare.

Riassumo in questo quadro i risultati:

Innesto nella capsula articolare del ginocchio di mesentericus fuscus a dosi piccolissime.

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in patata dai varii organi					
			Capsula articolare	Tessuti periarticolari	Gangli	Fegato	Milza	Rene
1° Coniglio .	1000 gr.	dopo 2 ore	+	+	—	—	—	—
2° Coniglio .	1200 gr.	dopo 6 ore	+	+	—	—	—	—
3° Coniglio .	1050 gr.	dopo 24 ore	+	+	+	—	—	—
4° Coniglio .	1000 gr.	dopo 48 ore	+	+	+	—	—	—

Esame necroscopico.

Nei conigli della 1ª serie non si constatano alterazioni nei vari organi.

Nel 1° coniglio il ginocchio innestato non si presenta ingrossato, però aperta la cavità articolare, sgorga una discreta quantità di essudato siero-ematico.

Nel 2°, 3° e 4° coniglio il ginocchio si mostra tumefatto, e aperta la cavità dell'articolazione, viene fuori copiosa quantità di liquido siero-ematico.

Esame microscopico dell'essudato.

In tutti i conigli l'essudato mostra numerosi globuli rossi. Leucociti mono e polinucleati. Scarse figure di fagocitosi da parte dei leucociti. Numerosi batteri fuori le cellule.

Esame microscopico dei tessuti.

1° *coniglio. Capsula articolare.* — L'endotelio appare necrotico. Infiltramento parvicellulare dei tessuti periarticolari. Numerosi batteri liberi nei tessuti che attorniano la capsula. Negli organi interni (fegato, rene, gangli) non si notano nè batteri, nè alterazioni.

2° *coniglio.* — Uguale al 1°.

3° *coniglio.* — Il reperto della capsula è uguale al 1° e 2°. Nei gangli inguinali e lombari si osservano alterazioni non tanto gravi rappresentate da infiltramento parvicellulare nella sostanza corticale e midollare. Scarsi batteri ridotti in frantumi sempre fuori le cellule.

4° *coniglio.* — Uguale al 3°.

Serie 2ª. — Sarebbe stato del tutto superfluo eseguire le ricerche della 2ª serie, dati i risultati della serie precedente. Infatti, è logico credere che se piccole dosi di mesentericus non vengono distrutte nella capsula ed è possibile rintracciare nei tessuti periarticolari batteri in piena proliferazione, con più forte ragione, i batteri patogeni si mostreranno più resistenti. Però per ragione del metodo, che ho seguito e per vedere anche come reagisce la capsula articolare ai patogeni, ho voluto eseguire anche quest'ultima serie innestando nella capsula articolare piccole dosi di stafilococco aureo.

Innesto nella capsula articotare del ginocchio di stafilococco aureo a dosi piccole.

Animale	Peso dell' animale	Uccisione	Innesto in agar dai varii organi					
			Capsula articolare	Tessuti periarticolari	Gangli	Fegato	Milza	Rene
1° Coniglio .	800 gr.	dopo 2 ore	+	+	+	—	—	—
2° Coniglio .	1000 gr.	dopo 6 ore	+	+	+	—	—	—
3° Coniglio .	900 gr.	dopo 24 ore	+	+	+	+	+	+
4° Coniglio .	1050 gr.	dopo 48 ore	+	+	+	+	+	+

Esame necroscopico.

1° coniglio. — Aperta la cavità articolare fuori esce una discreta quantità di liquido siero-ematico.

Macroscopicamente non si rivela alcuna alterazione sugli organi interni (fegato, rene, milza, gangli).

2° coniglio. — Uguale al 1°.

Nel *3° e 4° coniglio* i fatti sono più accentuati e si osservano i gangli lombari ed inguinali tumidi. Il fegato e la milza appaiono congesti ed ingranditi di volume.

Esame microscopico degli essudati.

1° e 2° coniglio. — Numerosi corpuscoli rossi. Masse necrotiche granulose diffusamente colorate. Leucociti in abbondanza con nuclei appena visibili. Si osserva qualche leucocito con batteri inglobati. I batteri sono numerosi e liberi.

Esame microscopico dei tessuti.

1° coniglio. Capsula articolare. — L'endotelio della sinoviale si presenta fortemente necrotico. Infiltramento linfoide nei tessuti periarticolari, dove sono anche evidenti numerosi batteri in attiva proliferazione.

2° coniglio. — Si osservano gli identici fatti osservati nel 1° coniglio. Nei gangli si riscontra infiltramento linfoide nella sostanza corticale e piccole quantità di batteri.

3° coniglio. — Nella capsula si osservano fatti necrotici degli endoteli della sinoviale come sopra. Numerosi batteri nei tessuti periarticolari e nei gangli. Scarsi batteri negli altri organi.

4° coniglio. — Come il 3°.

Conclusioni della III parte.

1° L'endotelio della sinoviale articolare si altera rapidamente anche in presenza di scarsi batteri.

2° I gangli linfatici si oppongono validamente all'invasione dei germi che hanno superato la barriera degli endoteli.

Considerazioni sui risultati ottenuti.

Da ciò che ho esposto non si può venire ad una conclusione semplice, che permetta d'interpetrare i fatti nel modo il più naturale possibile. Farò delle considerazioni partitamente per le diverse parti o meglio per i diversi endoteli esaminati.

Per l'endotelio della sierosa peritoneale mi sembra che sia sufficientemente dimostrato un potere protettivo piuttosto elevato, che si estrinseca potentemente purchè si verifichino due condizioni:

1° Che il peritoneo sia integro;

2° Che i germi non siano tanto numerosi o eccessivamente virulenti.

Dire che esiste un potere protettivo non basta, perchè era cosa

già conosciuta. È interessante invece indagare il meccanismo con cui si estrinseca questo potere protettivo. Ho passato in rassegna le diverse opinioni al riguardo e da ciò che ho riassunto più avanti si può dedurre che un buon numero di osservatori credono che il peritoneo esercita il suo ufficio protettivo in grazia di una intensa fagocitosi, che vi si stabilisce sia a spese dei leucociti che delle cellule endoteliali.

Non tutti gli osservatori sono concordi nell'ammettere questa fagocitosi, anzi parecchi negano ogni importanza al fatto, e spiegano in altro modo la resistenza che oppone il peritoneo alla penetrazione dei germi.

Dalle ricerche che ho fatto mi pare che non sia sufficientemente dimostrata l'ipotesi del valore protettivo della fagocitosi nel peritoneo, perchè essa nella maggioranza dei casi o manca o è scarsa.

Il valore protettivo del peritoneo si può mettere in rapporto con due fatti che si constatano in ogni caso, cioè: 1° il ringiovanimento degli elementi endoteliali, e 2° la proliferazione del connettivo stromatico.

Si sa dalle ricerche del Maffucci che gli elementi giovani (embrionari) ostacolano lo sviluppo dei batteri così fortemente da arrivare perfino a distruggerli.

Nel peritoneo deve avvenire qualche cosa di simile. Gli elementi ringiovaniti modificano l'ambiente, rendendo impossibile la vita dei germi.

Per interpetrare il fatto si possono invocare due ipotesi: o che gli elementi ringiovaniti secernono un quid ad azione antibatterica; ovvero che essi modificano il plasma in modo da essere solamente adatto ai bisogni dell'elemento giovane, mentre è insufficiente al mantenimento della vita dei batteri. Quest'ultima ipotesi, che a me pare molto logica, è sostenuta dalle conoscenze che si hanno oggi sul metabolismo dei tessuti embrionari.

Si sa infatti che esiste una profonda differenza tra il ricambio organico dei tessuti vecchi e di quelli giovani, in quanto che nei primi la vita è rappresentata dall'alternarsi continuo di processi anabolici e catabolici, mentre nei secondi i processi anabolici sono di gran lunga più spiccati in confronto dei fatti di catabolismo.

Quindi nel plasma che circonda gli elementi giovani si trovano pochi prodotti regressivi e molte sostanze che non hanno subìto l'elaborazione cellulare.

Il secondo fatto poi può interpetrarsi nel senso che avvenga qualche cosa di simile a quello che il prof. Manfredi ha dimostrato per i gangli.

Nei gangli invasi dai batteri si produce proliferazione del connettivo stromatico in modo che i vasi linfatici restano parzialmente obliterati, impedendo in tal modo che i germi vengano trasportati in circolo dalla linfa.

Lo stesso meccanismo può invocarsi pel peritoneo, nel quale si constata una rigogliosa proliferazione di connettivo.

Per l'endotelio dei vasi non mi pare che si possa ammettere come dimostrato alcun valore protettivo.

Se qualche sperimentatore è riuscito a constatare la fagocitosi negli endoteli vasali, ciò non significa ch'è riuscito a dimostrare in essi un valore protettivo.

Infatti, come ho ricordato sopra, la fagocitosi negli endotelii vasali non si osserva costantemente, e per metterla in evidenza si richiedono speciali condizioni (Uccisione degli animali dopo poco tempo dall'innesto — Culture freschissime — Innesto nella marginale dell'orecchio).

Nei casi poi in cui si riesce ad osservare la fagocitosi, accanto ai batteri inglobati si notano numerosi batteri liberi e fuori dei vasi. Nelle serie di animali in cui non si constata fagocitosi nè degli endotelii vasali nè dei leucociti, i conigli non uccisi sopravvivono malgrado l'inoculazione dei batteri.

Da questi fatti si è costretti necessariamente ad invocare altre potenze protettive, onde spiegarci la ragione per cui gli animali innestati con batteri patogeni per la via dei vasi sanguigni, superano l'infezione.

Rispetto al valore protettivo della sinoviale articolare bisogna convenire che anche per le lievi infezioni l'endotelio si necrotizza e i batteri in primo tempo si riscontrano nei tessuti periarticolari, in seguito si possono rintracciare deformati solo nei gangli, ove si notano anche lievi alterazioni.

Quindi si può dire che se non esistesse il sistema gangliare, le infezioni articolari sarebbero di gran lunga più perniciose delle infezioni peritoneali.

Sento il dovere di ringraziare l'illustre prof. Luigi Manfredi dei valevoli aiuti e consigli datimi, per il compimento delle presenti ricerche.

Palermo, 1° ottobre 1902.

BIBLIOGRAFIA.

AUCHÉ e CHAVANNAZ. *Résistance des séreuses à quelques agents infectieux.* Comptes rend. de la Soc. de Biolog., n. 39, p. 1145.

BANTI. *Sulla distruzione dei batteri nell'organismo.* Arch. per le scienze mediche, 1888.

GOLDSCHEIDER e R. MÜLLER. Fortschritte d. Medic., 1895.

GARNIER. *Destruction des microbes dans la cavité péritonéale.* Annales Pasteur, 1897.

W. HIS. *Der Keimwall des Hühnereies, und die Entstehung der parablastichen Zellen.* Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschicht. Anat. Abth., 1876.

MANFREDI. *Sull'importanza del sistema gangliare linfatico nella dottrina moderna dell'infezione e dell'immunita.* Lavori del laboratorio d'igiene della R. Università di Palermo, 1898.

ID. *I gangli infatici nella difesa dell'organismo contro la tubercolosi.* Lavori del laboratorio d'igiene della R. Università di Palermo, 1899-1901.

METCHNIKOFF. *Léçons de pathologie comparée de l'inflammation.* Edit. Masson, Paris.

PAWLOWSKY. *Sur l'histoire du développement et du mode de propagation de la tubercnlose des articulations.* Annales Pasteur, 1892.

PFEIFFER. *Weitere Untersuchungen über das Wesen der Cholera-immunität und über specifischbaktericide Processe.* Zeitschrift f. Hygiene, 1894.

PIERALLINI. *Phagolysè dans la cavité péritonéale.* Annales Pasteur, 1897.

ZIEGLER. *Der Ursprung der Mesenchymatischen Gewebe bei Sclachiern.* Arch. f. Mikr. Anat., 32, 1888.

WERIGO. *Des globules blancs comme protecteurs du sang.* Ann. Pasteur, 1891.

WIDAL RAVAUT e DOPTER. *Sur l'évolution et le rôle phagocytaire de la cellule endothéliale.* Comptes-rendus de la Soc. de Biologie, Paris, 1902.

WISSOKOWITSCH. *Ueber die Schicksale der ins Blut injicirten Mikroorganismen in Körper der Warmblüter.* Zeitschrift f. Hygiene, 1886.

ISTITUTO D'IGIENE MUNICIPALE DI LIMA

Sulle emoagglutinine del sangue umano

e sulla tecnica della agglutinazione in generale

Ricerche del dott. U. BIFFI, medico igienista del Municipio di Lima

(con la tavola III).

PARTE I.

Il fenomeno dell'agglutinazione dei globuli rossi di un animale, per effetto del contatto col siero di un altro animale di specie differente, fu osservato già da parecchio tempo. Soltanto la interpretazione del fatto era distinta da quella che si suol dare al giorno d'oggi.

« Era già nell'opinione di parecchi sperimentatori » dice il Landois « che anche i corpuscoli rossi potessero contribuire alla formazione della fibrina quand'io, nel 1874, riuscii a convincermi *de visu*, seguendo sotto il campo del microscopio la trasformazione degli stromi dei corpuscoli rossi in fibre di fibrina. Se difatti si porta una gocciolina di sangue defibrinato di coniglio nel siero di rana, senza agitare, si osserva che i corpuscoli sanguigni rossi si dispongono vicini, si fanno vischiosi alla superficie e aderiscono fra loro. Una adatta pressione sul coprioggetti ne fa convinti che non è agevole vincere codesta adesione; i corpuscoli non si distaccano per seguire la forza che li preme ma tutto al più la secondano distendendosi a guisa di fili. Alcuni poi, i più periferici, cominciano a lasciar uscire il pigmento o, in altre parole, cominciano a scolorarsi. Lo scoloramento procede dalla periferia, s'avanza verso il centro, lo raggiunge, ed allora non resta che un piccolo accumulo di stroma aderente. La sostanza dello stroma presenta una grande vischiosità: da principio si può riconoscere in essa anche i contorni rotondi dei singoli corpuscoli; ma non così in seguito non appena cioè, per pressione e per spostamento del coprioggetti, si origina una corrente di siero che è il liquido di chiusura del preparato. Allora la massa intera viene agitata di qua e di là, gli stromi che si trovano a contatto e incollati fra loro si allungano a guisa di fili e di strie, con la contemporanea sparizione

dei contorni cellulari. Così si può passo passo seguire la formazione di fibre di fibrina dagli stromi dei corpuscoli rossi. I corpuscoli rossi dell'uomo e degli animali, che si sciolgono nel siero di altri animali differenti, mostrano spessissimo la medesima cosa ».

Abbiamo voluto riportare per intero questo brano del Landois perchè, oltre ad essere storicamente interessante rappresenta altresì, a parte i fatti emolitici e la interpretazione, una descrizione esatta del fenomeno che ci occupa, quando esso si presenta in modo molto evidente.

In un grande numero di infezioni era stato notato da antichi osservatori che i globuli rossi hanno (è questa la frase con cui si esprimono) una vischiosità che li fa aderire e impedisce che si dispongano a pila, come di consueto. Rayer, Davaine. Pollender hanno veduto che nel sangue carbonchioso le emazie sono frangiate, deformi e *agglutinate* in masse irregolari.

Hayem ha dimostrato che in molte malattie acute le emazie non si dispongono come di consueto nei preparati a fresco in isolotti contornati dal mare plasmatico, ma in ammassi compatti e contigui. Egli ha dato il nome di *sang phlegmasique* al sangue che presenta tali caratteri. Attribuisce il fatto a un cambiamento nel modo di coagulazione della fibrina e alla variata quantità di questa.

Cito qui le osservazioni che si riferiscono all'aggruppamento irregolare delle emazie nel sangue di un individuo senza intervento di un altro sangue o di un altro siero, perchè esse devono riportarsi, come dimostrerò in seguito, al medesimo ordine di fenomeni che oggi sono compresi sotto il nome di emoagglutinazione.

Tutti gli autori suaccennati posero in rapporto l'agglutinamento osservato colla coagulazione del sangue e fu solo in questi ultimi anni, dopo gli studi di Pfeiffer, Gruber, Widal, ecc., sull'agglutinazione dei batteri e la dimostrazione dell'analogia stretta che passa fra emolisi e batteriolisi, fra immunizzazione verso i batteri e immunizzazione verso emazie di specie animali differenti, fra agglutinazione dei microbi ed emoagglutinazione, dataci sopratutto dalle ricerche di Buchner, Daremberg, Belfanti e Carbone, dalla scuola di Metchnikoff e da Ehrlich e Morgenroht che si venne ad una interpretazione del tutto diversa del fenomeno e si dimostrò che esso era indipendente dalla precipitazione della fibrina. Si vide che, come per inoculazioni ripetute di un animale con un dato batterio, si ottiene un siero capace di agglutinare e, qualche volta, in circostanze speciali, di sciogliere quel determinato batterio, così mediante inoculazioni ripetute di un animale col sangue di

un altro si ottiene un siero capace di agglutinare e di sciogliere i globuli rossi dell'animale il cui sangue ha servito per la inoculazione. Il fatto è, di regola, molto marcato se i due animali in esperimento sono di specie differente, meno se della stessa specie, nullo o quasi nullo se si tratta un animale col proprio sangue. Per ciò che riguarda la sostanza emolitica Ehrlich e Morgenroth chiamarono, come è noto, *eterolisina* quella capace di sciogliere gli eritrociti di animali di specie differente, *isolisina* quella capace di sciogliere gli eritrociti di un individuo della stessa specie e *autolisina* la emolisina supposta, ma fino ad ora non dimostrata, che si otterrebbe mediante la inoculazione di un animale col proprio sangue.

Analogamente si possono distinguere le emoagglutinine in *eteroagglutinine*, *isoagglutinine, autoagglutinine.*

Nel sangue umano di individui sani e di malati si notarono da Maragliano, Landsteiner, Donath, Lo Monaco e Panichi, Grixoni, M. Ascoli, Camus et Pagniez, Novi e Meruzzi, Capogrossi, ecc., sostanze iso-agglutinanti. Ascoli afferma altresì che nel siero di soggetti sani si possono trovare, quantunque in piccola quantità, sostanze autoagglutinanti, sostanze cioè capaci di agglutinare i globuli dello stesso individuo.

Mi sembrò il fenomeno dell'emoagglutinazione nel sangue umano degno di ulteriore studio per le possibili applicazioni alla diagnostica clinica e alla medicina legale, e perchè sono convinto che questi fatti hanno nella fisiologia patologica generale una importanza superiore di molto a quella che è stata loro concessa fino ad oggi.

***

Riferirò brevemente le *mie ricerche.* Esse furono eseguite su 140 individui dei quali 100 apparentemente sani e 40 malati. In parecchi gli esami furono ripetuti molte volte.

Dei 40 malati 18 erano malarici, 7 affetti da verruga peruana (malattia di Carrion), 4 da polmonite franca, 2 da pleurite, 1 da piemia, 2 da febbre tifoide, 1 da ittero catarrale febbrile, 2 da vizio cardiaco scompensato, 2 da cirrosi epatica e 1 da ascesso epatico.

Cominciai dal ripetere le esperienze più importanti degli autori precedenti e specialmente quelle di Lo Monaco e Panichi e di Ascoli. Mi servii naturalmente della tecnica da loro indicata e potei confermare in gran parte i loro risultati. Constatai cioè che il sangue o il siero di un individuo malarico ha il potere di agglutinare il sangue di un altro malarico e quello di un sano (Lo Mo-

naco e Panichi) che questa proprietà la si riscontra anche in molti altri stati morbosi (Lo Monaco e Panichi, Grixoni, Capogrossi, ecc.), che il siero di sangue di soggetti normali può agglutinare le emazie di altri individui sani (Landsteiner, Ascoli, Camus et Pagniez), che i globuli di diversi sangui, anche provenienti da individui apparentemente normali sono diversameute sensibili alle sostanze agglutinanti (Ascoli), che il solfato di chinina all'1 per cento in soluzione fisiologica aggiunto al siero malarico non toglie ad esso, contrariamente a quanto affermano Lo Monaco e Panichi, il potere agglutinante (Capogrossi).

Per ciò che riguarda la importanza che il fenomeno dell'agglutinazione può avere nella diagnosi di malaria latente, io mi sono convinto che essa è nulla o quasi nulla non solo perchè si può riscontrare in molti altri stati morbosi, ma anche perchè si possono trovare, come a me è successo due volte, sieri normali dotati di un potere agglutinante maggiore di quello di alcuni sieri malarici per una stessa qualità di globuli rossi. Se i globuli rossi su cui si sperimenta provengono poi da individui diversi, allora è molto più facile trovare sieri sani dotati di potere agglutinante superiore a quello di sieri malarici. Vale a dire che esaminando il sangue di una decina di individui sani è ben difficile non imbattersi in differenze spiccatissime nel potere agglutinante del siero e nel potere di agglutinarsi dei globuli.

Si troveranno dunque facilmente un siero ad alto potere agglutinante, globuli molto agglutinabili ed altri pochissimo sensibili alle sostanze agglutinanti. Ora se si fa agire il siero normale ben agglutinante sui globuli rossi molto sensibili si otterrà facilmente una agglutinazione più spiccata che facendo agire alcuni sieri deboli di malarico sui globuli poco agglutinabili. È un fatto questo che io ho visto più volte e che ognuno può facilmente ripetere e constatare da sè.

Ciò che si dice per la malaria vale anche per le altre malattie in cui si suole constatare l'agglutinazione. Io sono convinto quindi che *al fenomeno dell'agglutinazione, come tale non si può mai dare importanza diagnostica seria.*

Potrebbe essere invece che avesse importanza la curva del potere agglutinante del siero determinata metodicamente nelle varie forme morbose usando per la formazione di ciascuna curva sempre i globuli rossi dello stesso individuo sano. È probabile in altre parole che si verifichi per l'agglutinazione ciò che succede per la febbre: non è tanto l'aumento della temperatura quanto l'anda-

mento di essa che è caratteristico ed ha importanza diagnostica. Del resto ulteriori studi chiariranno la questione.

Trovo poi molto giusta la critica mossa da Ascoli alla tecnica usata da Lo Monaco e Panichi della mescolanza del sangue di un malarico col sangue sano e forte compressione successiva della miscela fra copri- e portaoggetti invece dell'esame in goccia pendente della miscela del siero malarico con una sospensione dei globuli rossi in soluzione fisiologica di Na Cl. E ciò non solo perchè, come osserva Ascoli, con tal procedimento non si sa se l'agglutinazione sia dovuta all'azione del siero del malarico sui globuli del sano o viceversa, ma anche perchè entra in campo l'elemento *compressione del preparato* che non può assolutamente essere costante in ogni caso.

Per quanto riguarda l'osservazione di Ascoli che il sangue normale può agglutinare, quantunque debolmente, i propri globuli, le mie esperienze non mi permettono di confermarla che in parte. Se dal medesimo individuo sano si prelevano contemporaneamente le due porzioni di sangue che devono somministrare rispettivamente i globnli e il siero e si fa agire questo su quelli, si può osservare la nota disposizione a pila ma non si osserva mai una vera e propria agglutinazione. Se invece siero e globuli si prelevano in tempi diversi si può osservare, quantunque assai di rado, un lievissimo agglutinamento. Non così quando si tratta di malati. Io ho osservato infatti ripetutamente un potere agglutinante abbastanza elevato di alcuni sieri patologici sui globuli rossi dello stesso individuo estratti contemporaneamonte al siero stesso. Ma di questo fatto parlerò separatamente in seguito.

Ascoli ed altri autori affermano molto giustamente che distinti sieri normali hanno diverso potere agglutinante sugli eritrociti di un dato individuo normale e che i globuli di diversi soggetti normali sono diversamente agglutinabili rispetto allo stesso siero. Però questi osservatori non hanno stabilito se esista una relazione e quale essa sia fra il potere agglutinante del siero e il potere di agglutinarsi dei globuli.

Io lavorando contemporaneamente coi sieri e coi globuli di molti diversi individui normali, combinandoli pazientemente fra di loro e per giudicare del grado di potere agglutinante e rispettivamente di agglutinabilità, servendomi delle diluzioni fatte colla tecnica di cui dirò appresso, mi sono potuto convincere che un certo rapporto fisso realmente esiste e che questo rapporto si può formulare nel modo seguente: *in uno stesso sangue umano normale il potere agglutinante del siero è in ragione inversa del grado di agglutinabilità degli*

eritrociti. Quanto maggiore è il potere agglutinante nel siero tanto minore è il potere di agglutinarsi nei globuli. Dati dunque due sangui, di cui l'uno abbia globuli ben agglutinabili dalla maggior parte dei sieri normali e l'altro invece male agglutinabili, il primo avrà un siero poco attivo sulla maggior parte dei sangui normali ed il secondo invece molto attivo. Il siero del mio sangue, ad esempio, ha un potere agglutinante assai elevato sui globuli di moltissimi altri sangui normali: viceversa è assai difficile trovare un siero normale capace di agglutinare i miei globuli rossi; in quelle poche volte in cui mi riuscì di trovarlo questo siero agglutinava anche tutti gli eritrociti che era capace di agglutinare il mio siero e i globuli del suo sangue non erano agglutinati dal siero mio.

È chiaro che quando si lavora con molti sieri e molti sangui, si giudica del grado di agglutinabilità degli eritrociti o di potere agglutinante del siero dalla diluzione massima a cui il fenomeno avviene ancora in modo evidente. Credo inutile aggiungere che non si deve ricercare nè aspettarsi nella manifestazione di questi fenomeni biologici una precisione assolutamente matematica.

La regola a cui abbiamo accennato sta del resto bene in armonia col fatto citato sopra, che cioè quando si prelevano da un individuo sano i globuli e il siero nello stesso tempo, quelli non sono agglutinati da questo, ciò che succederebbe inevitabilmente se in uno stesso individuo si trovassero contemporaneamente siero ad alto potere agglutinante e globuli ben agglutinabili. Tutto ciò naturalmente ammettendo che le agglutinine presenti nei sieri normali siano fra di loro equipollenti. Che così sia veramente ce lo prova la esperienza seguente da me ripetuta molte volte e sempre collo stesso risultato.

Data, per esempio, una serie di 5 sangui normali *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, differentemente agglutinabili e di cui *a* sia il meno ed *e* il più agglutinabile e dato un siero capace di agglutinarli tutti quantunque in grado differente, se si fa soggiornare per 24 ore il siero in contatto intimo con un eccesso dei globuli *e*, esso perde le sue proprietà agglutinanti per tutta la serie dei sangui. I globuli più sensibili all'agglutinazione sono capaci dunque di esaurirlo completamente, di sottrargli cioè tutte le agglutinine che conteneva.

Tutto quanto ho detto si riferisce però esclusivamente al sangue normale; il sangue di malati si comporta spesso come il normale ma non sempre. E a proposito di sangue patologico voglio qui consegnare alcune osservazioni da me fatte sulla relazione che passa fra il potere agglutinante del siero del sangue e quello di essudati o trasudati presenti nello stesso individuo. Si tratta di 4

casi: nel 1° trattavasi di ascite in un cardiaco, nel 2° di versamento peritoneale in un caso di polisierosite, nel 3° di siero prelevato dal pericardio e dal peritoneo di un individuo morto di perniciosa, nel 4° caso del liquido di una pleurite acuta nelle prime giornate di malattia.

Nei tre primi individui trovai che il siero del sangue possedeva un potere agglutinante spiccatamente superiore a quello delle altre sierosità, nel 4° invece il liquido pleurico aveva lo stesso potere agglutinante che il siero del sangue. È inutile aggiungere che in tutti i casi mi servii della stessa qualità di globuli rossi per tutti gli esperimenti relativi allo stesso individuo. Data la scarsezza del numero delle osservazioni non credo di poterne trarre altra conclusione che la seguente: *il potere agglutinante del siero del sangue può essere molto distinto da quello di essudati o trasudati eventualmente presenti nello stesso individuo.*

***

Passiamo ora a considerare un'altra serie di fenomeni molto importanti, a mio modo di vedere, quelli cioè dell'*auto-agglutinazione nel sangue di individui infermi di alcune affezioni acute.* Abbiamo detto sopra come Rayer, Davaine e Pollender avessero osservato e Hayem studiato il fatto, verificantesi in alcune malattie ad insorgenza rapida, di un aggruppamento anormale degli eritrociti nei preparati a fresco del sangue. Abbiamo detto altresì che questi AA. misero in rapporto il fenomeno osservato con una abnorme vischiosità delle emazie o con modificazioni (Hayem) nella coagulazione del sangue. Nessuno, che io mi sappia, ha ripreso lo studio di questi fatti dopo le ricerche odierne sulla emolisi e sull'agglutinazione; nessuno li ha considerati secondo le vedute moderne. Eppure è indubitato che si tratta di fenomeni perfettamente analoghi a quelli che oggidì sono studiati sotto la denominazione di « agglutinamento dei globuli rossi ». Anzi io posso ora asserire che si tratta di fatti identici; si tratta in altre parole di una formazione rapida ed abbondante di autoagglutinine nel sangue umano in alcuni speciali stati morbosi.

Ed è facile comprendere come la cosa avvenga. Sappiamo che esistono sangui umani, i cui globuli sono molto agglutinabili. Le mie ricerche hanno dimostrato che il fenomeno della autoagglutinazione in questi casi non si verifica e ciò non già perchè la qualità della agglutinina non sia uguale per tutti i sieri normali, ma perchè il siero corrispondente possiede un potere agglutinante minimo, una

quantità di agglutinine piccolissima. Però questo potere agglutinante in alcuni stati morbosi può crescere rapidamente ed in modo notevole. Ne deriva, per un certo tempo almeno, il fatto abnorme della presenza nello stesso sangue circolante di un siero fortemente agglutinante e di globuli ben agglutinabili. Se noi facciamo in questo tempo un preparato del sangue, osserveremo il fenomeno dell'autoagglutinazione. Esso sarà tanto più spiccato quanto più si modifica il rapporto stretto che normalmente esiste nel sangue fra potere agglutinante del siero e agglutinabilità degli eritrociti.

Basta pensare a ciò che avviene nell'accesso malarico in cui ci troviamo sempre o quasi sempre di fronte a un siero di alto potere agglutinante, molto superiore a quello che si nota negli stessi individui allo stato normale. Perchè in queste condizioni non si verificasse autoagglutinazione sarebbe necessario che con uguale rapidità avvenisse una modificazione nel potere di agglutinarsi dei globuli rossi, una specie di vaccinazione rapida di questi contro le agglutinine neoformatesi, una neoformazione rapida di antiemoagglutinine per cui il rapporto normale fra potere agglutinante del siero ed agglutinabilità dei globuli rimanesse invariato. E ciò non avviene o, per meglio dire, non avviene nei casi in cui, come appunto nell'accesso malarico, la formazione di agglutinine nel sangue è notevole per quantità e rapidità. Soltanto se la produzione delle agglutinine continua per un tempo relativamente lungo, allora si modifica considerevolmente il grado di agglutinabilità dei globuli.

Tutto questo io ho potuto constatarlo sperimentalmente. Gli esperimenti sono così semplici che ognuno può ripeterli facilmente da sè.

Prelevando il sangue colla pipetta speciale descritta più avanti, rimane nella parte bassa della medesima, sotto al siero, uno strato più o meno considerevole di globuli rossi. Se il sangue è normale questi globuli sono disgiunti gli uni dagli altri o riuniti a pile; una goccia di questo sangue trasportata in un vetrino da orologio e mescolata con una piccola quantità di soluzione fisiologica di Na Cl, dà una emulsione omogenea di eritrociti nella soluzione fisiologice stessa. In parecchi stati morbosi invece, e nella malaria in special modo si rinvengono molti gruppi di eritrociti fortemente agglutinati; la soluzione fisiologica non li disgiunge, cosicchè è impossibile ottenere in questi casi una sospensione omogenea delle emazie nella soluzione salina.

Ma del resto, che nella malaria e in altri stati morbosi esista spesso una forte autoagglutinazione se ne potrà convincere chiunque faccia una serie di preparati a fresco di sangue di individui sani

e di malati, lasciando qualche secondo la gocciolina di sangue sul copri-oggetti prima di schiacciarlo contro il porta-oggetti. Operando in tal guisa si noterà che in parecchi stati morbosi e sopratutto nella malaria, si ottengono preparati di sangue agglutinato così come se si fossero mescolati i sangui di due malarici o di un sano ed un malarico, secondo il procedimento usato da Lo Monaco e Panichi.

Per questo è tanto difficile ottenere uno strato omogeneo di globuli nei preparati a fresco fatti per lo studio dei sangue malarico, mentre è tanto facile ottenerli da un sangue normale.

Come ho detto sopra, se la produzione di agglutinine nel sangue dura poi un certo tempo, allora è dimostrabile una specie di adattamento dei globuli rossi al nuovo mestruo carico di sostanze agglutinanti; la loro resistenza all'agglutinazione aumenta. Si può constatare agevolmente questo fatto nella polmonite franca, malattia in cui, come io ho potuto constatare si una produzione rapida abbondante e durevole di sostanze agglutinanti. Dopo tre o quattro giorni di malattia è dimostrabile la variazione del grado di agglutinabilità dei globuli rossi dell'infermo per rispetto a uno stesso siero che si conserva a scopo di controllo. È inutile dire che mi sono assicurato prima che il siero, conservato anche per molti giorni, non varia il suo potere agglutinante.

Quali siano gli stati morbosi in cui più frequentemente si verificano le condizioni necessarie per la autoagglutinazione, io non posso dire per ora non avendo avuto opportunità di ricercare questo fenomeno che in un numero molto limitato di casi. Posso affermare di averlo visto molto spiccato, ma non costantemente, nell'accesso febbrile della malaria, nella prima giornata della polmonite franca e nel periodo febbrile della verruga peruana. Però è probabilissimo che in tutti i casi in cui Hayem ha osservato il tipo di sangue da lui chiamato *sang phlegmasique* si verifichi l'autoagglutinazione. Ciò mi sembra tanto più verosimile in quanto che io ho potuto provare ripetutamente che questo fenomeno non si può assolutamente metterlo in rapporto colla formazione di fibrina e colla coagulazione del sangue.

E l'ho dimostrato in tre modi:

1. Constatata in un caso l'autoagglutinazione prelevavo un po' di sangue da quel dato infermo e lo defibrinavo immediatamente; nel sangue defibrinato si poteva osservare la agglutinazione.

2. Ottenuta da una certa quantità di sangue la separazione del siero riscaldavo questo a 60° C. per mezz'ora. Il siero così trattato

dava ancora agglutinazione coi globuli dello stesso individuo prelevati nello stesso tempo.

3. Raccoglievo il sangue in soluzione fisiologica contenente ossalato sodico, secondo il metodo proposto dal Petrie per gli esperimenti sulla emolisi e scioglievo d'altra parte nel siero ossalato sodico in notevole quantità.

Ponendo a contatto il siero ed il sangue così trattati si aveva ancora agglutinazione.

Resta dunque intanto assodato che *in alcune condizioni morbose può verificarsi temporaneamente nel sangue estratto dai vasi il fenomeno della autoagglutinazione e che questo fenomeno non dipende affatto dalla coagulazione del sangue.*

Sorgono ora spontanee varie domande: potrà in qualche caso verificarsi parzialmente la agglutinazione nel sangue circolante? Possono alcuni fenomeni morbosi (embolie, fenomeni cerebrali in genere nelle perniciose) aver origine da questo fatto? Essendo molto elevato il potere autoagglutinante del plasma, là dove si rallenta la corrente sanguigna potrà verificarsi l'agglutinazione? Il tumore acuto di milza che si presenta appunto più specialmente in quelle malattie in cui si ha formazione rapida di agglutinine nel sangue potrà dipendere in parte dalla autoagglutinazione? A tutte queste dimande non si può rispondere se non sperimentalmente ed è quanto mi propongo di fare in un prossimo lavoro.

***

Durante lo studio dell'agglutinazione nel sangue normale io mi sono chiesto *se le spiccate differenze che esistono fra il sangue di diversi individui per ciò che riguarda il potere agglutinante del loro siero e l'agglutinabilità dei loro globuli potesse servire in qualche caso a scopo medico legale,* e *mi sono convinto con ripetute esperienze che realmente, dato il concorso di favorevoli circostanze, si possono trarre da questi fenomeni preziose indicazioni.*

Il metodo biologico introdotto, in seguito alle geniali ricerche di Bordet, da Uhlenhuth e da Wassermann e Schültze nella medicina legale ha già dato, quantunque nuovo, brillanti risultati nella diagnosi delle macchie di sangue quando si tratta di riconoscere se una determinata macchia appartenga a un animale o ad un individuo della specie umana. Mai, che io mi sappia, si è però affrontato il problema della possibilità di una distinzione fra il sangue di un uomo e quello di un altro uomo. Ora la esperienza mi ha insegnato che la cosa non è sempre impossibile.

Dato un siero *a* normale, ricco in isoagglutinine, una emulsione in soluzione di NaCl dei globuli dello stesso sangue *a* e un'altra emulsione di globuli *b* molto sensibili appartenenti al sangue di un altro individuo, se si mescolano i due sangui si fa agire su una goccia del miscuglio il siero, si vedrà che mentre i globuli *b* si cercano, direi quasi, si attraggono e si agglutinano prontamente in ammassi compatti e fortemente colorati, quelli del sangue *a* rimangono completamente disgiunti. Se al miscuglio delle due emulsioni si aggiunge il siero corrispondente ai globuli *b* non si verifica agglutinazione di sorta alcuna. Perchè l'una qualità di globuli sia ben distinguibile al microscopio dall'altra si procede nel modo seguente: per fare l'emulsione *a* si adopera la colonnetta di globuli rossi rimasti qualche giorno sotto al siero dentro alla pipetta (vedi parte II), e per l'emulsione *b* globuli freschi provenienti direttamente dall'individuo. Come avremo occasione di notare in seguito, le due qualità di globuli si distinguono bene in tali condizioni e per il colore e per la grandezza. Questo esperimento il cui risultato non può arrivarci nuovo, dopo quanto è stato detto sopra, ci dimostra nel modo più chiaro la possibilità di una distinzione fra i due sangui *a* e *b*.

Enumeriamo brevemente le *circostanze in cui l'agglutinazione può servire a scopo medico-legale.*

Si tratta, per es., di orizzontarsi nel giudicare a quale di molti individui indiziati possa appartenere una data macchia di sangue. Dovremo procedere nel modo seguente: se la macchia è abbastanza grande la si divide per metà. Dalla prima metà si estraggono i globuli rossi coi metodi noti nella tecnica microscopica applicata alla medicina legale e si sospendono in piccola quantità di soluzione 0.85 °/₀ di NaCl. Poi si mescola una goccia del siero dell'individuo sospetto ed una della emulsione dei globuli rossi. Se si verifica una spiccata reazione agglutinante quella macchia non può appartenere al sangue di quel dato individuo perchè, come abbiamo visto, il siero di un sano non agglutina mai in maniera evidente i propri globuli. Se sono parecchi gli individui indiziati si possono eliminare tutti quelli il cui siero dà una reazione agglutinante evidente coi globuli rossi estratti; la macchia non può appartenere al loro sangue.

Spesso però accade che i globuli rossi non si sono conservati, che non è possibile estrarli, nemmeno alterati, dal materiale in esame. Allora si prende la seconda metà della macchia e si procede alla estrazione del siero disseccato mediante una piccola quantità di acqua distillata. La quantità di acqua che si impiega deve essere

presso a poco uguale al volume del sangue che ha originato la parte di macchia su cui si opera. Si preparano poi emulsioni dei globuli degli individui che devono essere esaminati. Si fa agire separatamente su queste emulsioni l'estratto della macchia: in alcuni casi osserveremo agglutinazione evidente e potremo escludere gli individui corrispondenti. Anche quando si possono ottenere i globuli non dovrà mai trascurarsi la prova del siero perchè è la più sicura; anzi, se il materiale di cui si dispone è poco, sarà meglio non tentare nemmeno l'estrazione dei globuli e attenersi soltanto alla prova del siero.

Un'altra circostanza in cui l'agglutinazione presta buoni servizi è quando si tratta di sapere se diverse macchie di sangue appartengono tutte allo stesso individuo o ad individui diversi. Si estraggono separatamente i globuli dalle varie macchie e si cerca un siero capace di agglutinare quelli di una di esse. Questo siero aggiunto nelle stesse proporzioni alle emulsioni degli altri globuli dovrà agglutinarli nello stesso modo.

Così pure, in mancanza dei globuli e come prova di controllo si potrà estrarre il siero dalle macchie, e trovati globuli capaci di agglutinarsi col siero estratto da una di esse, questi dovranno agglutinarsi, se le macchie appartengono allo stesso sangue, nello stesso modo con tutti gli altri.

Finalmente può avvenire che si abbia la certezza, in seguito ad indizi e prove di altra natura, che una data macchia deve essere di uno di due individui senza che si sappia a quale dei due appartenga. In queste circostanze la distinzione è, come si capisce agevolmente, quasi sempre facile e solo impossibile nel caso raro in cui le proprietà agglutinanti siano perfettamente uguali nel sangue delle due persone.

Da quanto si è detto sopra si comprende poi la importanza che può avere il conservare una piccola quantità di sangue (se è possibile siero e sangue defibrinato separatamente) prelevato dal cadavere in casi di omicidio cruento. Questa pratica non dovrà, a mio modo di vedere, essere mai trascurata in seguito.

Le applicazioni medico-legali dei fenomeni dell'agglutinazione sono fondate naturalmente sulla supposizione che nei singoli individui sani il siero mantenga per lungo tempo invariato il suo potere agglutinante e i globuli non cambino il loro grado di agglutinabilità. In altre parole bisogna essere sicuri che, per ciò che riguarda l'agglutinazione, il sangue di un dato individuo ha mantenuto le stesse proprietà dal momento in cui si formò la macchia a quello in cui si procede al riconoscimento della medesima. La cosa era

troppo evidente e troppo importante perchè io non abbia cercato di assicurarmi in proposito. Ho seguìto il potere agglutinante del siero di alcuni individui e l'agglutinabilità dei loro globuli per molto tempo (3-4 mesi), e mi sono potuto convincere della sorprendente costanza che si riscontra; le oscillazioni che si notano sono addirittura minime e tali che possono benissimo attribuirsi ad errori di tecnica. Mi sono fatto, ad esempio, piccole prelevazioni di sangue mattina e sera durante un mese e non sono riuscito a dimostrare variazioni evidenti. Ciò non ostante sarà opportuno, nel valersi dell'agglutinazione a scopo medico-legale di attenersi soltanto a fenomeni molto spiccati, a reazioni veramente nette e chiare anche perchè, come vedremo, la normale disposizione a pila dei globuli rossi può alle volte presentarsi sotto forma di una lievissima agglutinazione.

Altri fatti importanti, sopratutto dal punto di vista medico-legale e degni di speciale menzione, sono i seguenti:

1° Il sangue delle macchie conserva inalterato per lungo tempo il suo potere agglutinante e la proprietà di agglutinarsi;

2° Il siero di sangue liquido sterile mantiene lungo tempo invariato il potere agglutinante;

3° Le agglutinine del sangue umano resistono alla putrefazione e non vengono alterate dall'aggiunta al siero liquido di cloroformio, canfora, timolo o piccole quantità di iodo (sieroiodato);

4° La emoglobina non entra per nulla nel fenomeno dell'agglutinazione e quindi basta poter estrarre da una macchia di sangue gli stromi degli eritrociti perchè la prova riesca egualmente bene. Di questo ultimo fatto è facile convincersi allungando una emulsione in soluzione fisiologica di globuli rossi agglutinabili per mezzo di un dato siero, con acqua distillata fino ad estrazione di emoglobina. Depositatisi gli stromi in fondo al recipiente si decanta il liquido colorato soprastante, si lavano varie volte gli stromi con soluzione fisiologica, per decantazione e si sospendono in un volume di soluzione uguale a quello primitivo della emulsione. Ripetendo ora la prova dell'agglutinamento collo stesso siero si ottengono i medesimi precisi risultati come se i globuli contenessero ancora la loro emoglobina. Così pure l'agglutinazione si verifica egualmente bene su globuli deformati, frantumati, ridotti in semplici granuli modificati in modo che nulla più conservino della forma primitiva.

***

Che rapporto esiste fra l'agglutinazione dei globuli rossi e la disposizione a rotolo di moneta o a pila che prendono normalmente nel sangue lasciato in riposo fuori o dentro i vasi?

La ragione per cui i globuli rossi si dispongono a pila non è stata data ancora; almeno non si è trovato una spiegazione completa, soddisfacente, definitiva. Si attribuì dapprima il fatto, così come Hayem fece per l'auto-agglutinazione, alla produzione di fibrina ma si vide in seguito che non poteva esservi tale rapporto. Walker e la maggior parte degli autori con lui attribuiscono siffatta disposizione ad una attrazione fisica che subiscono tutti i corpi piatti mobili in un liquido, i quali tendono sempre a mettersi in contatto per la superficie più estesa. Duval osserva però giustamente che la spiegazione è insufficiente e che bisogna tener conto anche di un certo grado di viscosità della sostanza dei globuli perchè quando questi sono stati trattati coi reattivi fissatori (per esempio, soluto osmico) che induriscono la loro superficie senza deformarla questo impilamento non si produce. È noto d'altra parte a chiunque abbia fatto un conteggio di globuli rossi che quando le emazie si trovano sospese anzichè nel loro siero, in soluzione fisiologica, pur rimanendo inalterate, non si dispongono a pila quantunque abbiano conservato questa proprietà, perchè se vengono riportati in siero il fenomeno riappare. Myers e Ascoli ritengono perciò che il potere agglutinante del siero produca l'avvicinamento della emazie e la loro adesione a rotolo di moneta.

Le mie ricerche mi permettono di affermare a questo proposito che *all'impilamento concorre bensì una sostanza agglutinante, ma questa è diversa dalla isoagglutinina che si riscontra nel siero di sangue normale.* Infatti, se si pone in contatto un siero normale fortemente agglutinante per determinati globuli con una grande quantità di globuli e si lasciano così in contatto per 24 ore, si osserva, come già abbiamo visto, che tutte le sostanze agglutinanti si fissano ai globuli, cosicchè il siero ne resta privo. Se si mette questo siero in contatto con una nuova porzione degli stessi globuli non si osserva naturalmente più la agglutinazione ma si osserva ancora la disposizione a pila, e la si osserva altresì ponendo in contatto il siero con globuli normali di altra provenienza. Lo stesso fatto si nota se si ripete l'esperimento, mescolando un siero con un eccesso di globuli dello stesso sangue a cui appartiene il siero. In altre parole mentre è possibile togliere ad un siero normale le vere agglu-

tinine fissandole a globuli rossi molto sensibili alle medesime, non si riesce mai a privarlo della sostanza che produce l'impilamento. Dunque questa sostanza agglutinina deve essere diversa dalle altre. Ho ripetuto molte volte le esperienze descritte e sempre collo stesso risultato.

D'altra parte, però, è assolutamente certo che a produrre la disposizione a pila concorre una sostanza agglutinante formata, come le altre, di due componenti di cui l'uno si trova nel siero e l'altro nei globuli rossi. Il seguente esperimento me lo ha dimostrato all'evidenza: se una emulsione di globuli rossi in soluzione fisiologica viene sottoposta per qualche ora all'azione del formolo (una goccia di formolo per ogni cmc. di emulsione) si ottiene una deformazione particolare dei globuli rossi, una specie di leggero accartocciamento in modo che non possono più combaciare di piatto gli uni cogli altri. Riportando questi globuli nel proprio siero si notano piccoli aggruppamenti che sostituiscono la disposizione a pile. Se l'azione del formolo viene prolungata per molto tempo, neppure l'aggruppamento si verifica più. In questa esperienza viene eliminato l'elemento fisico della disposizione a pile e rimane il solo elemento biologico. L'attrazione dei globuli cambia aspetto, ma si verifica ancora finchè la formalina non ha indurito troppo i loro stromi.

Devesi dunque ritenere che perchè si verifichi l'impilamento dei globuli rossi concorrono due condizioni: la presenza di una speciale sostanza agglutinante distinta dalla altre agglutinine del sangue normale e la conservazione perfetta della forma piatta speciale dei globuli stessi.

Ad un'altra questione importante desidero ancora accennare di sfuggita, alla questione cioè dei *rapporti che passano fra le emoagglutinine e le emolisina.* Nei numerosissimi esperimenti che in questi ultimi anni si sono fatti per studiare il meccanismo di immunizzaziono verso i globuli rossi, si è visto che parallelamente alla neoformazione di emolisine si ha anche quella di emoagglutinine. Se queste ultime non furono notate da tutti gli sperimentatori, dipese dal fatto che quando si portano a contatto eritrociti con un siero contenente emolisine ed emoagglutinine attive per quei dati eritrociti, l'azione delle prime spesso prevale e impedisce che si manifesti quella delle seconde. Però se, come ha fatto London, si riscalda il siero per mezz'ora a 56° C, l'azione emolitica scompare e resta soltanto quella agglutinante. Questi fatti messi in rapporto cogli altri già scoperti da Ehrlich e Morgenroth dell'essere la emolisina composta di due sostanze di cui una si distrugge alla temperatura di 56° C e l'altra resiste, fecero sorgere naturalmente l'ipotesi che la

agglutinina che si forma contemporaneamente all'emolisina altro non fosse che quella parte che resiste a 56°. E questa è appunto l'opinione di London; ma molti autori e sopratutto Metchnikoff e la sua scuola non la dividono. Ultimamente poi Dubois avrebbe dimostrato in modo decisivo la indipendenza assoluta della agglutinina dalla sostanza sensibilizzatrice ottenendone sperimentalmente la dissociazione.

Per ciò che riguarda le emoagglutinine dei siero umano normale e di quello patologico io posso affermare che resiste benissimo, senza alterarsi affatto, alla temperatura di 56° C per mezz'ora e si comporta quindi a questo riguardo precisamente come gli *immunkörper* di Ehrlich e Morgenroth (sensibilizzatrice di Bordet, desmon di London, fissatore di Metchnikoff). Ciò nonostante altre esperienze ed altre considerazioni ci conducono, quantunque indirettamente, a negare l'identità fra sensibilizzatrice ed isoagglutinina nel sangue umano. Infatti se la isoagglutinina che si forma in gran copia in in certi strati morbosi (accesso malarico) fosse una sensibilizzatrice, sarebbe facile trovare in un altro siero una alessina capace di completarla rendendo così il siero stesso emolitico. Ora tutte le esperienze che io ho tentato in questo senso con siero di malarici mi hanno dato risultati costantemente negativi come già avevano dato resultato negativo i numerosi tentativi fatti da Celli, Carducci e Casagrandi per mettere in evidenza una emolisina nella malaria. Deve quindi ritenersi anche per le emoagglutinine umane che esse non corrispondono ad una sensibilizzatrice, che la loro comparsa non produce un cambiamento nel potere emolitico del siero e che il loro ricambio nell'organismo umano malato può essere indipendente da quello delle emolisine.

Conclusioni.

1. Nel sangue umano di individui sani possono esistere isoagglutinine in notevole quantità.

2. In condizioni fisiologiche si osserva il fatto che in uno stesso sangue umano il potere agglutinante del siero per rispetto agli eritrociti di altri sangui è in ragione inversa del potere di agglutinarsi dei globuli per opera di altri sieri. In uno stesso sangue, a siero molto agglutinante corrispondono globuli poco sensibili all'agglutinazione.

3. Le isoagglutinine dei sangui umani normali differiscono fra loro per quantità ma non per qualità.

4. In casi patologici può constatarsi la formazione nel sangue di una autoagglutinina. Fra la formazione di questa autoagglutinina e la coagulazione del sangue non esiste rapporto alcuno.

5. Il tipo del sangue per ciò che riguarda il contenuto in agglutinine del suo siero e l'agglutinabilità dei suoi globuli si mantiene nei singoli individui sani costante per molto tempo.

6. È possibile col concorso di favorevoli circostanze risolvere per mezzo della agglutinazione il quesito medico-legale se una data macchia appartenga ad uno piuttosto che ad un altro individuo della specie umana.

7. A produrre il fenomeno conosciuto sotto la denominazione di « disposizione a pila dei globuli rossi » concorre una agglutinina: questa è però sempre distinta anche per qualità dalle altre emoagglutinine che si possono trovare contemporaneamente nel sangue.

8. La emoagglutinina del sangue umano non corrisponde alla parte termostabile di una emolisina.

PARTE II.

Costretto dalla molteplicità grande degli esperimenti e dalla loro natura delicata a cercare un modo rapido ed allo stesso tempo esatto di eseguirli, sono giunto ad alcune modificazioni della tecnica che descriverò, perchè le credo interessanti sotto vari punti di vista: per il tempo che risparmiano all'operatore, per la precisione e facilità dell'esperimento, per essere applicabili su vasta scala anche in altri ordini di ricerche (emolisi, agglutinazione dei batteri), perchè, richiedendo solo piccole quantità di materiale, permettono lunghe serie di osservazioni nello stesso individuo senza causare soverchia molestia e quindi senza provocare giuste rimostranze e proteste e perchè finalmente ognuno può costruirsi da sè con una spesa insignificante e nel più modesto dei laboratori gli apparecchi necessari.

Raccolta del siero. — Dopo molti tentativi che sarebbe qui inutile ricordare ho costruito un piccolo apparecchio che serve molto bene per ottenere una separazione netta di siero da piccole quantità di sangue. Consta semplicemente di una pipetta Pasteur fatta con un tubo di vetro di 5-8 mm. di diametro interno e munita nella sua parte superiore di una strozzatura distante 12-15 cm. dal punto in cui il tubo largo si continua in quello più ristretto che serve di punta alla pipetta stessa (Tav. III fig. *A*). Chiamo, nella descrizione, estremità inferiore della pipetta quella della punta e superiore l'altra. Dentro alla pipetta, nella parte compresa fra le due porzioni ristrette del tubo si trovano 3-5 tubetti sottilissimi di vetro (Tav. III fig. *C*) saldati insieme per le loro estremità e lunghi circa $^2/_3$ del tratto di pipetta che li contiene.

Questi capillari di vetro sono liberi dentro alla pipetta, ma, quando ci si vuol servire di essa, conviene aver cura che si trovino nella parte più vicina alla punta. Nel tratto di tubo compreso fra le due strozzature si fa poi per mezzo di una comune lima triangolare da ferro, bagnata con acqua una profonda intaccatura che permetta di spezzare facilmente il tubo in quel dato punto, quando si voglia. La intaccatura deve trovarsi fra i due terzi inferiori e il terzo superiore del tratto di tubo che consideriamo. I tubetti capillari si ottengono nella fabbricazione delle pipette stesse e vengono introdotti, come ben si comprende, nel tubo grosso prima di praticare la strozzatura superiore.

Le pipette così preparate si chiudono inferiormente e si sterilizzano nella stufa a secco.

Per prelevare il sangue si fa una puntura al paziente nel polpastrello di un dito che si avrà avuto cura di disinfettare bene previamente. Io mi servo a questo scopo di una soluzione di formalina al 10 °/₀ in alcool comune. Per fare la puntura si usi una lancetta da salasso che oltre ad avere una buona punta sia anche ben tagliente ai due lati; la puntura dovrà essere profonda un paio di millimetri. In queste condizioni il sangue esce spontaneamente o sotto leggerissima pressione. Rotta la punta della pipetta si accosta questa goccia formatasi sul polpastrello del dito tenendola in posizione orizzontale: il sangue sale dapprima per capillarità nel tubetto terminale e ben presto arriva in contatto degli altri piccoli tubi contenuti nell'interno e addossati alla parete del tubo maggiore. Allora il sangue continua a salire fra i tubetti interni e fra questi e la parete della pipetta cosicchè, se si è proceduto convenientemente, si riesce a prelevare la quantità voluta di sangue senza applicare affatto la bocca alla pipetta ciò che è vantaggioso sopratutto per la ragione che così si evita l'ingresso di bolle d'aria e si rende possibile, anzi facile, la prelevazione di sangue sterile.

Terminata l'operazione, la quantità di sangue prelevata deve trovarsi utta attorno ai tubetti interni e fra questi e la parete della pipetta su cui riposano, ma non deve toccare la parete opposta della pipetta stessa, non deve insomma occupare l'intero lume del tubo in nessuna parte. Sempre tenendo la pipetta orizzontale la si salda alla fiamma, prima alla punta poi in corrispondenza della strozzatura superiore. La fiamma sia piccola; quella di un cerino basta; se si riscalda soverchiamente una certa quantità di sangue si avrà il siero tinto in roseo dalla emoglobina. Si lascia poi il tubo orizzontale per qualche minuto perchè il sangue coaguli completamente e quindi lo si pone verticale con la parte che non contiene sangue in basso; dopo 1-2 ore si trova in essa una quantità di siero limpido che rappresenta la metà circa in volume del sangue prelevato; dopo 12-24 ore il volume del siero rappresenta circa i $^{2}/_{3}$ di quello del sangue (Tav. III fig. *B*).

Sotto al siero, quando si tratta di sangue normale e di alcuni speciali sangui patologici, si forma una colonnetta di globuli rossi liberi sfuggiti al coagulo sanguigno: quando invece si lavora con sangue di malarici, di verrucosi, di polmonitici ed in vari altri casi patologici questa colonnetta non si forma od è piccolissima ed allora si raccoglie il solo siero limpido. Penso che questa diversità sia in relazione colla quantità varia di fibrina e col diverso modo di coagulazione del sangue. Ma non mi sono occupato di approfondire lo studio del fatto.

Quando si vuole impiegare il siero, si spezza il tubo in corrispondenza della intaccattura menzionata sopra e con una piccola pipetta comune si aspira il siero limpido avendo cura di non spingere la punta della pipetta fino a contatto dei globuli rossi che riposano sotto al siero. Questi globuli rossi sono molto ben conservati; essi possono servire per emulsioni in soluzione fisiologica; in essi si possono ricercare, volendo, i parassiti malarici. Però dopo 24-48 ore si trovano leggermente modificati; la modificazione è assai lieve e non si può notare con sicurezza se non mettendoli insieme ad altri globuli sanguigni recentemente estratti. Si vede allora che la loro forma è rimasta normale; però sono più piccoli e più intensamente colorati dei globuli normali. La diminuzione di volume deve essere in relazione probabilmente col fatto che la piccola evaporazione prodottasi nel siero ha reso il liquido, in cui sono sospesi, ipertonico.

Quanto poi alla colorazione più intensa, me la spiego col fatto del trovarsi la stessa quantità di emoglobina riunita in uno spazio più piccolo che nei globuli normali.

Ciò che è veramente interessante in tutto questo è la constatazione da me fatta ripetutamente che questi globuli così rimpiccioliti hanno spesso il colore preciso di quelli colpiti dal parassita malarico della febbre estivo-autunnale e che Marchiafava e Celli chiamarono con felice espressione *globuli ottonati*. Mescolando a sangue estratto di recente globuli dello stesso sangue conservati per 2-3 giorni nel modo detto sopra ci si procura l'illusione completa, per quanto riguarda i globuli ottonati, di star osservando un preparato di sangue malarico. *Fondandomi su queste osservazioni, io sono quindi di opinione che il cambiamento di colore che si osserva nei globuli colpiti dal parassita della malaria grave sia dovuto semplicemente al raggrinzamento, al rimpicciolimento dei globuli stessi.*

Defibrinazione del sangue. — La defibrinazione di piccole quantità di sangue si fa molto facilmente colla pipetta rappresentata dalla figura *D*, Tav. III.

Si tratta di una pipetta comune nella quale penetra fino alla parte ristretta un filo di rame che sostiene vicino alla sua estremità inferiore un rotoletto di finissima reticella metallica di ferro o di ottone. Questo piccolo rotolo cilindrico è di diametro poco inferiore a quello interno della pipetta e lungo da mezzo a un centimetro. Il filo che lo sostiene passa superiormente fra il batuffolo di cotone e la parete della pipetta e si ripiega sul suo orlo superiore.

Con questa pipetta sterilizzata si estrae nel solito modo una piccola quantità di sangue, si chiude la punta alla lampada e quindi con movimenti di va e vieni impressi al cilindretto di rete metallica si sbatte il sangue prelevato e in pochissimo tempo lo si defibrina completamente senza inquinarlo. Quando si vuol impiegare il sangue defibrinato non si deve far altro che rompere la punta della pipetta e lasciare sgocciolare la quantità necessaria. Una sola avvertenza è indispensabile a questo punto ed è che, appena defibrinato il sangue, conviene sollevare il fiio di rame e la relativa reticella metallica in modo che non resti a contatto col sangue stesso.

Ho osservato infatti che se questo contatto è prolungato per qualche tempo, produce alterazioni notevoli nel sangue, le quali si rendono soprattutto palesi con una parziale diffusione dell'emoglobina nel siero. Il fatto è

già chiaro dopo 24 ore; all'esame microscopico però non si nota evidente deformazione degli elementi morfologici, nemmeno dopo vari giorni. Ho ripetuto la prova anche con altri metalli comuni. Il piombo altera il sangue molto meno rapidamente; l'ottone presso a poco come il rame, così pure il ferro dolce; il platino naturalmente non provoca alterazioni di sorta. Curiosa è la rapidità e la energia con cui lo zinco modifica il sangue: la formazione del coagulo è ritardata, il siero fin da principio carico di emoglobina; dopo 24 ore il sangue è trasformato in una massa coagulata di color rosso nerastro che, esaminata al microscopio, non lascia più riconoscere gli elementi morfologici del sangue. L'odore di questa massa è penetrante e uguale a quello che si nota per azione di un alcali energico su corpi albuminoidi, a quello che si avverte, per es., quando ci bagniamo le mani con una soluzione di soda o potassa caustica.

Diluizione del siero. — Il piccolo apparecchio rappresentato dalla Tav. III fig. *E* non è se non una modificazione di quello già descritto da me e da Galli nel nostro lavoro « Per la batteriologia del typhus levis. » Il cambiamento principale consiste nel cappuccio di gomma che chiude la estremità del tubo più grande e nel foro laterale. Queste modificazioni permettono di esercitare lievi e regolari pressioni e aspirazioni nell'interno del tubo senza bisogno di applicarvi continuamente la bocca, ciò che nei laboratorii di batteriologia è sempre poco piacevole e raccomandabile. Inoltre, quando non sia necessario applicarvi la bocca, si può seguire molto meglio ciò che avviene nell'interno dell'apparecchio.

Questo diluitore consta dunque di un grosso tubo d'assaggio a cui si è praticato un piccolo foro in fondo ed un altro lateralmente a circa 5 cm. dalla sua estremità superiore. Questa viene chiusa con un comune cappuccetto di gomma cercando che rimanga ben teso. Nel foro praticato nel fondo si fa passare un tubettino capillare e lo si fissa con ceralacca in modo che resti per metà libero e per metà sporgente nel mezzo del lume della provetta. Nella parte libera a distanza di 1-2 cm. dalla estremità si fa un segno circolare.

Il modo di servirsi dell'apparecchio è semplicissimo; supponiamo di voler praticare varie diluizioni uniformemente crescenti di un dato siero e di voler fare con una parte di ciascuno dei liquidi che ne risultano e una uguale quantità di emulsione di eritrociti un preparato in goccia pendente. Si aspira soluzione fisiologica di Na Cl precisamente fino alla marca circolare del tubetto; se per errore si è passata, avvicinando un pezzetto di carta bibula all'estremo del capillare si assorbe l'eccesso di liquido. Si continua poi a fare una leggera aspirazione finchè la colonnetta liquida che si era formata all'estremo del capillare salga alquanto dentro di questo, sì che disti più di mezzo centimetro dalla estremità libera del medesimo. Allora avvicinando il tubetto a una goccia di siero si preleva da questa un'altra colonnetta liquida perfettamente uguale a quella di soluzione salina. Il siero si manterrà separato dalla soluzione di Na Cl per mezzo di un piccolo spazio pieno d'aria (Tav. III fig. *G*). Esercitando ora una leggerissima pressione nell'interno del tubo grande mantenuto orizzontale, il siero prima e la soluzione salina poi escono e si raccolgono e mescolano intimamente in una sola goccia che si viene formando all'estremità del capillare e si raccoglie alla superficie inferiore esterna di esso (Tav. III fig. *F*). Questa goccia la si

deposita su di un vetrino porta-oggetti avendo cura di lasciare l'apparecchio orizzontale, giacchè se la goccia capitasse di nuovo in corrispondenza dell'estremo libero del tubetto, inevitabilmente risalirebbe. Si preleva poi da essa, come si è fatto la prima volta dal siero, materiale per una nuova diluizione in parti uguali con soluzione salina. In tal modo si preparano quante diluizioni si desiderano.

Su ciascun vetrino copri-oggetti rimane, come è chiaro, una quantità di liquido uguale a quello che può essere contenuto nel capillare fino alla sua marca circolare e sull'ultimo vetrino una quantità doppia. Praticato il numero di diluizioni voluto, a ciascuna di esse si aggiunge, sempre per mezzo del diluitore, un volume uguale di emulsione di globuli rossi o, se si tratta di un batterio, di sospensione omogenea del batterio in un liquido conveniente. Con ciascuno dei vetrini si prepara poi una goccia pendente. Fra una diluizione e l'altra conviene naturalmente lavare sempre il capillare internamente con soluzione fisiologica.

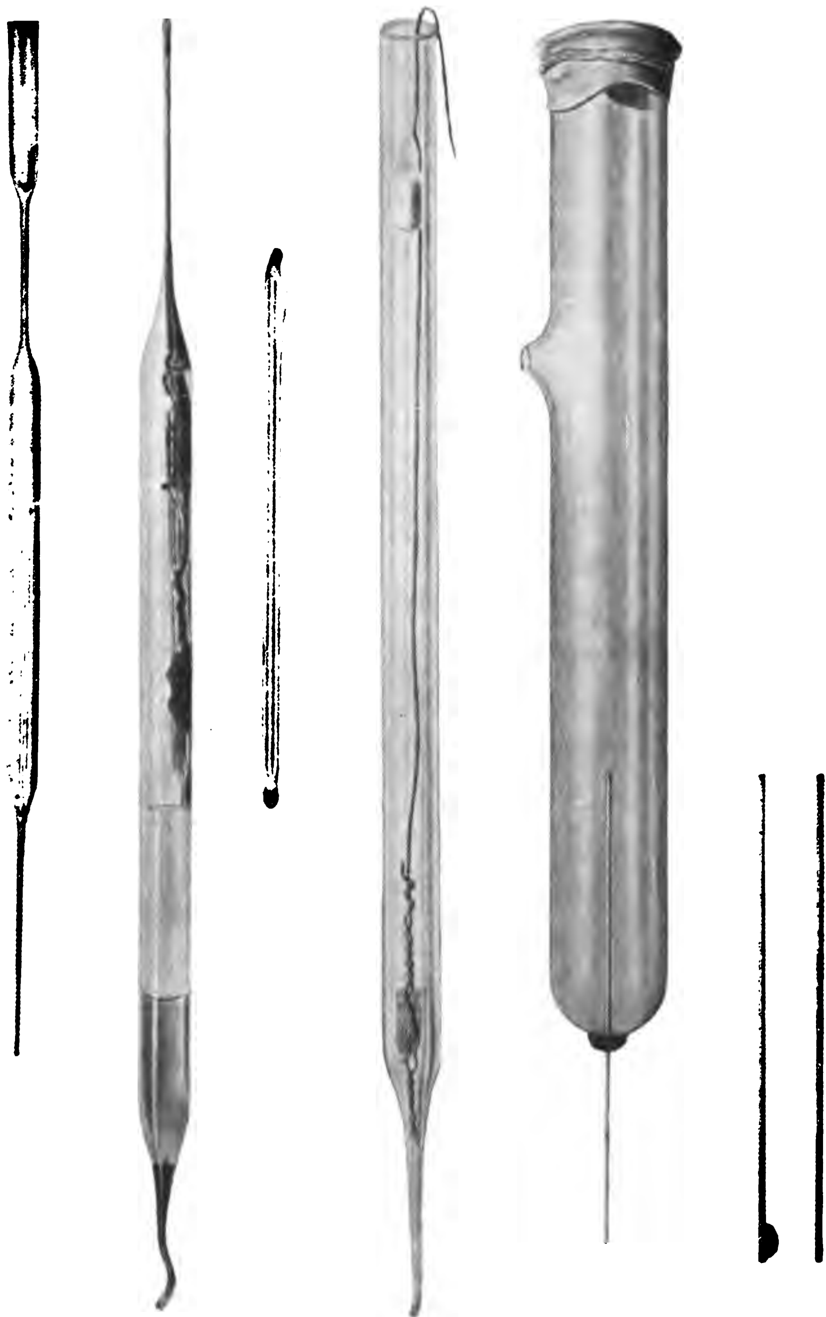
Se si vuol evitare una serie di diluizioni ed ottenere fino dal principio una diluizione molto forte allora conviene graduarsi il capillare oppure, se si possede un capillare di diametro interno uniforme, si può procedere sulla guida di un nastro misuratore, come è detto nel lavoro citato sopra. Quando si lava il capillare bisogna avere l'avvertenza di vuotarlo completamente del liquido di lavaggio, ciò che si ottiene tenendolo, mentre si scaccia il liquido, colla estremità applicata a un pezzetto di carta bibula.

Per comprendere come si possa fare pressione o aspirazione nell'interno del tubo grande basta dare un'occhiata alla Tav. III fig. *E*. L'istrumento viene sorretto dalla mano destra: l'indice collocato sul cappuccio di gomma, l'anulare sul foro laterale, il pollice, che rimane dal lato opposto alla stessa altezza, e il medio e il mignolo servono a sostenere l'apparecchio. Per fare pressione si chiude il foro laterale e si preme sul cappuccio di gomma; per aspirare si apre il foro laterale, si preme sulla gomma, si richiude il foro e si fa cessare lentamente la pressione.

Le figure della tavola annessa a questo lavoro sono tutte di grandezza di $^1/_3$ del naturale salvo la prima che è solo metà del vero.

I piccoli apparecchi descritti possono essere costrutti facilmente, come dissi, da ognuno nel più modesto dei laboratori; non credo dunque del caso l'insistere sul modo di prepararli; chi volesse dettagli può trovarli nel trattato di tecnica batteriologica dell'Abba o nel manualetto dell'Ebert sulla lavorazione del vetro

Lima, 3 dicembre 1902.



SPIEGAZIONE DELLA TAV. III.

Apparecchi per la raccolta del siero (fig. *A*, *B*, *C*), per la defibrinazione del sangue (fig. *D*), per la diluizione del siero (fig. *E*, *F*, *G*).

BIBLIOGRAFIA.

1. ABBA F. *Manuale di microscopia e batteriologia applicate all'igiene.* Torino. Clausen. 1902.
2. ASCOLI M. La Clinica med. ital. 1901. N. 1, pag 43-46. N. 7, pag. 393-403.
3. BIFFI U. e GALLI P. Rivista critica di clin. med. 1901. N. 3.
4. CAMUS ET PAGNIEZ. Comptes-rendus de la Soc. de biol. de Paris. Mars. 1901.
5. CAPOGROSSI A. R. Accad. med. di Roma. Resoconti della Riforma medica. 1901. Vol. III, pag. 151.
6. CELLI, CARDUCCI e CASAGRANDI. Questi Annali. 1902. Fasc. II, pag. 215.
7. DONATI. Wien. Klin. Woch. 1900. N. 22.
8. DUBOIS A. Annales de l'Inst. Pasteur. 1902. N. 9, pag. 690.
9. DUVAL M. *Compendio di istologia.* Trad. ital. di R. Fusari e L. Sala. Torino, 1899. pag. 525.
10. EBERT. H. *Anleitung zum Gasblasen.* Leipzig. 1895.
11. GRIXONI G. Gazzetta degli osp. e delle clin. 1901. N. 57, pag. 599.
12. HAYEM G. Citato nel Traité de méd. de Charcot, Bouchard et Brissaud. Paris, 1892. Tom. II, pag. 487.
13. LANDOIS L. Trattato di fisiologia dell'uomo. Milano, Vallardi. Parte 1ª, pag. 54
14. LANDSTEINER M. Centr. f. Bak. und. Paras. 1900. IX. N. 10.
15. LO MONACO E PANICHI. *Sul fenomeno dell'agglutinazione nel sangue dei malarici.* Roma. Tip. della R. Acc. dei Lincei. 1900.
    Il Policlinico. Luglio 1901. N. 48.
16. LONDON M. E. S. Archives des sciences biologiques. St. Pétersburg 1901. N. 3 e 4, pag. 285-352.
17. MARAGLIANO E. Congresso di med. int. Lipsia, 1892. Citato da Ascoli.
18. METCHNIKOFF E. *L'immunité dans les maladies infectieuses.* Paris. 1901, pag. 75 SS.
19. MYERS. Centralbl. f. Bakter. Vol. 26. N. 5.
20. NOVI E MERUZZI. Il Policlinico. 20 luglio 1901. N. 50.
21. PETRIE G. F. The Lancet. 1902. N. 4094, pag. 439.
22. ROGER, DAVAINE, POLLENDER. Citati da G. Roger. *Les maladies infectieuses.* Paris, 1902, pag. 673.

NB. Mi è parso superfluo citare tutta la bibliografia, d'altra parte così nota, riguardante le emolisine e il meccanismo dell'emolisi. Per essa rimando al lavoro di E. London e al trattato di Metchnikoff citati sopra.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

Sui metodi per giudicare dell'abitabilità delle case vecchie e nuove dal grado di umidità degli ambienti

Ricerche del dott. **O. CASAGRANDI.**

È da tempo che gli igienisti si sono occupati di stabilire, per mezzo di opportune indagini, il momento in cui si possono ritenere abitabili le case di nuova costruzione.

A tal uopo, da tempo si è compreso che non basta fondare il criterio di abitabilità sulla data della costruzione, ritenendo abitabili quelle che sono state costruite da un certo numero di mesi: si è quindi ideata una serie di procedimenti più o meno controllati o controllabili, più o meno adatti, e alcuni assolutamente empirici, altri fondati su criterii scientifici.

I. — METODI EMPIRICI.

I metodi empirici sono molteplici, e non varrebbe neanche la pena di parlarne, ove fra di essi non ve ne fosse qualcuno a cui si attribuisce importanza eccessiva.

Si suole tener conto, delle macchie che si trovano sulle pareti, dell'odore di muffa dopo avere tenuti chiusi gli ambienti, per un certo tempo, dell'ammuffimento delle scarpe, ecc.

In questi ultimi tempi poi si è dato molta importanza al metodo Esmark-Abba (1) consistente nel rilevare se fogli di gelatina ben secca attaccata alle pareti degli ambienti per due settimane nell'estate e tre nell'inverno, si rammolliscano e divengano pastosi.

---

(1) *Prontuario dell'Igienista.*

Questo procedimento ha però diversi inconvenienti: anzitutto non è sempre facile, specie quando si tratti di case vecchie poter tener chiusi gli ambienti da 8 a 24 giorni, poi ove si tratti di mura in qualche parte ricche di sali igroscopici, la gelatina, applicata a date parti di muro può rammollirsi mentre tutte le mura restanti non presentano traccie di umidità.

Tali appunti al metodo Esmarch-Abba ho avuto l'opportunità di notare, applicandolo all'esame dell'umidità delle pareti in una casa che tenni a mia disposizione dal 27 dicembre 1901 al 20 marzo 1902. Trattavasi di un ammezzato (nell'ala sinistra di un palazzo a due piani), che era costituito da tre camere prospicienti sulla strada (sud) comunicanti l'una con l'altra e dietro con un corridoio lungo quanto tutta l'ala della casa e prospiciente per mezzo di due finestre in un cortile ristretto. In fondo al corridoio, a destra del medesimo trovavasi la latrina e subito dopo una camera con finestra a balconcino, prospiciente nel cortile.

Il corridoio istesso immetteva poi in una scala che conduceva nel sotterraneo dove si trovavano gli stessi vani sopra enumerati meno la camera prospiciente nel cortile.

Durante le ricerche fatte mi sono anche avveduto che tale procedimento può essere influenzato dall'umidità esterna, e che ove si osservi la gelatina dopo pochi giorni dalla sua applicazione si possono trovare dei dati non uguali a quelli che si notano dopo maggior tempo di esposizione dei fogli negli ambienti stessi.

Ecco infatti i risultati che ottenni:

1° tenendo chiuse le finestre e le porte.

AMBIENTE	Muro	Stato delle lastre in gelatina dopo giorni					
		2	5	10	15	20	25
1ª camera anteriore	laterali . . .	—	—	—	—	—	—
	di strada . .	—	—	—	—	—	—
	del corridoio	—	—	—	—	—	—
2ª camera anteriore	laterali . . .	—	—	—	—	—	—
	di strada . .	—	—	—	—	—	—
	del corridoio	—	—	—	—	—	—
3ª camera anteriore	laterali . . .	—	—	—	—	—	—
	di strada . .	—	—	—	—	—	—
	del corridoio	—	—	—	—	—	—
Camera del cortile . .	del cortile .	+	++	+++	+++	+++	+++
	del corridoio	—	—	—	+	+	+
	del fondo. .	—	—	—	+	+	+
Corridoio dell'ammezzato .	laterale. . .	—	+	+	++	+++	+++
	esterno. . .	—	—	—	—	—	—
	interno. . .	—	—	—	—	-	—
Corridoio del sotterra . . .	esterno. . .	—	—	+	+	+	+
	interno. . .	—	—	—	+	+	+
Camera di mezzo del sotterra .	laterali . . .	—	—	—	—	+	+
	di strada . .	—	++	++	+++	+++	+++
	del corridoio	—	—	—	—	—	—
Camera dispensa del sotterra .	laterali . . .	—	—	—	—	—	—
	di strada . .	—	+	++	+++	+++	+++
	del corridoio	—	—	—	+	+	+

NB. Il segno + indica leggero rammollimento.
Id. ++ indica rammollimento e tendenza all'incurvamento.
Id. +++ indica rammollimento e incurvamento evidenti.
Id. — indica che il foglio di gelatina è rimasto asciutto e teso.

2° aprendo le finestre delle camere anteriori per 3 giorni durante giornate piovose, poi chiudendole per 5 giorni.

AMBIENTI	Mura	Dopo giorni 1	2	3	5
1ª camera anteriore.	laterali	+	+	+	+
	di strada	++	++	+	+
	del corridoio . .	+	+	+	+
2ª id. id.	laterali	+	+	+	+
	di strada	++	++	+	+
	del corridoio . .	+	+	+	+
3ª id. id.	laterali	+	+	+	+
	di strada	++	+	+	+
	del corridoio . .	+	+	+	+

NB. I segni +, ++, +++ hanno lo stesso significato indicato nel *NB.* della Tavola precedente.

Cioè, mentre il primo esame mi permetteva di dichiarare non umide le mura delle tre camere anteriori, ed umide almeno due delle mura della camera del cortile, e le mura del sotteraneo prospicienti nella strada, dopo il secondo esame, avrei dovuto mettermi in sospetto anche per le mura dell'ammezzato, che, come dirò poi in seguito, deducendolo dalle altre prove fatte col metodo Glässgen non erano umide.

Quindi, ove a questo procedimento volesse darsi importanza, a mio vedere, *occorre applicarlo quando si sia ben certi che esso non venga influenzato da cause estranee all'umidità delle mura dell'ambiente.* In ogni caso con esso, come è già stato fatto osservare da altri, non si può stabilire mai il grado di umidità delle mura anche nei casi in cui è palese essere al di là del tollerabile.

II. — METODI SCIENTIFICI.

I procedimenti fondati su criteri scientifici sono assai più numerosi, e possiamo oramai distinguerli in procedimenti fisici e chimici.

I metodi fisici consistono nel determinare le condizioni attuali

evaporimetriche, termometriche, barometriche dell'aria dell'ambiente o di quella che si aspira dalle mura.

I metodi chimici consistono nel determinare qualitativamente o quantitativamente il vapore acqueo che si trova nell'ambiente o che si aspira attraverso le mura, o la quantità dell'acqua che si trova nella malta.

A) Metodi fisici.

Sono essi fondati sull'uso degli evaporimetri, igrometri e psicrometri.

1. *Il metodo evaporimetrico* è stato preso in questi ultimi tempi in considerazione dal De Rossi (1) il quale ha potuto dimostrare, pure perfezionandolo, che su di esso non si può contare con sicurezza. L'autore si è servito degli evaporimetri di Piche, convenientemente modificati, rendendone più sottile la parte superiore in modo da poterli graduare in decimi di cmc., e facilmente calcolare l'evaporazione di 1/20 di cmc. ed ha concluso col dire che « senza escludere che l'umidità degli ambienti possa spiegare una certa influenza sulle determinazioni igro-psicro-evaporimetriche, certo esse per la incostanza dei risultati e per l'azione perturbatrice delle vicissitudini meteoriche non possono fornire criteri sicuri su cui basare la concessione o il rifiuto del permesso di abitazione delle case nuove ».

2. *I metodi igrometrici* finchè consistono nell'uso degli igrometri a capello non forniscono dati tali sui quali si possa stabilire giudizi esatti. Anche adoperando strumenti ben controllati, i risultati cui essi conducono sono assolutamente incostanti.

Io ho a lungo adoperato a tal uopo un igrometro di Saussure, un igrometro di Steppacher, due polimetri i cui dati ho posto in confronto con quello di un psicrometro di August, ma mi è stato impossibile da essi dedurne con precisione il grado di umidità relativa di un ambiente.

Non è quindi dopo ciò *a priori* accettabile il metodo del Beer (2) indicato dal Flügge (3), il quale consiglia di applicare al muro a tenuta un cassone parallelepipedo, nel quale, si contiene un igrometro a capello, e di aspirare l'aria dal cassone per un certo tempo, traendo dal confronto tra il grado igrometrico dell'aria che viene aspirata i dati per giudicare dell'umidità della parete.

---

(1) *L'umidità delle case nuove*. Questi Annali, Vol. IX, pag. 156.
(2) *U. d. Bestimmung d. Feuchtigheit d. Wände* (Cfr. lavoro di Emmerich e lavoro di Ballner).
(3) *Lehrbuch d. hyg. Untersuchungsmethoden*. 1881, p. 495.

E che questo metodo sia assolutamente fallace me ne sono convinto con alcuni esperimenti che qui brevemente riassumo.

In una camera dell'Istituto posta a nord-est, ho infisso in una parete un tubo di ottone (fig. I-*1*) attraversante una grande placca metallica quadrata la quale facevo aderire al muro per mezzo di mastice di Archanson costringendolo a rimanere aderente per mezzo di quattro chiodi passanti in quattro buchi situati agli angoli della placca.

Questo tubo per mezzo di un'altro tubo di gomma mettevo in comunicazione con una cassa di zinco, con la parete anteriore sostituita da un vetro cementato con margine di Archanson entro cui si trovavano gli igrometri a capello. Indi ponevo la cassetta in comunicazione con un aspiratore, per mezzo di un dispositivo semplicissimo aspirando 20–40 litri di aria.

Contemporaneamente col metodo di Glässgen ricercavo la quantità di acqua nella malta, e col psicrometro il grado di umidità relativa dell'aria dell'ambiente.

Trovai così i seguenti dati durante 8 osservazioni fatte:

Numero delle osservazioni	Umidità relativa esterna	Umidità relativa ambiente	Umidità relativa segnata dagli igrometri				Acqua °/₀ nella malta
			polimetro 1	polimetro 2	igrometro 1°	igrometro 2°	
1	84	78	73	75	69	81	2.10
2	55	61	70	71	75	79	2.65
3	46	60	74	66	59	61	2.78
4	63	60	73	77	63	69	3.09
5	66	78	60	85	85	76	2.28
6	62	73	60	70	78	84	2.35
7	50	81	60	85	85	75	3.12
8	14	70	68	88	75	63	2.98

NB La malta veniva prelevata dallo stesso muro da cui aspirava l'aria e col metodo Lehmann-Nussbaum veniva calcolato il °/₀ di acqua, tenendo conto dei risultati che si avevano, quando, pesando la malta, la seconda cifra decimale, si manteneva costante.

L'umidità relativa dell'ambiente veniva presa mediante un ottimo psicrometro di August; l'esterna è quella indicata dall'Osservatorio del Collegio Romano presa pressochè alla stessa ora (ore 15).

Le osservazioni vennero fatte nel gennaio-marzo 1902.

Come si vede i dati forniti dai diversi apparecchi sono abbastanza dissonanti tra di loro. Durante infatti la stessa osservazione alcuni apparecchi in date condizioni hanno dato dei valori che avrebbero fatto credere ad un eccessivo grado di umidità delle mura,

mentre l'esame delle malte col metodo ponderale si è mantenuto pressochè in limiti poco diversi dal 2 al 3 per cento.

3. Escludendo quindi dall'uso comune gli igrometri a capello, rimaneva a controllare il *metodo psicrometrico* che è assai usato e che è quello adottato dal Municipio di Roma sino dal 1865 epoca in cui tale indagine venne proposta dal Ratti.

Venne allora adoperato l'igrometro di Regnault che il Ratti modificò al solo scopo di poterlo con maggiore facilità trasportare da un luogo all'altro. Solo nel 1880 questo igrometro venne sostituito dal Fiorelli con quello a condensazione dell'Alluard.

Il Ratti, come riferisce il Fiorelli (1): « allorchè funzionò temporaneamente nell'anno 1866 da perito sanitario municipale, dopo varie e replicate esperienze da lui fatte in case vecchie ed asciuttissime, in case umide, addossate a terrapieni con mura salnitrate, nelle quali gli oggetti coprivansi di muffa, fissò che la frazione igrometrica di 0.75 dovesse considerarsi come troppo elevata; e che perciò solo che si fosse raggiunta tale frazione, dovesse dichiararsi l'appartamento troppo umido e per conseguenza inabitabile ».

Però aggiunge il Fiorelli: « la detta frazione venne stabilita in semplice linea di esperimento, ed io che ebbi l'agio e l'incarico di visitare tanto grande numero di case nuove, per lo sviluppo edilizio straordinario di Roma, specie in questi ultimi anni, fui costretto per le osservazioni fatte, ad abbassare la suddetta frazione a 0.65, frazione che ho i miei buoni motivi di ritenere ancora alta, e perciò si debba ancora, e sono sicuro che la esperienza mi darà ragione, diminuire ».

Tale metodo è stato oggetto di varie critiche: lo Spataro per es. (2) dice: « l'assorbimento di vapore dipende dal *deficit di saturazione* posseduto dall'aria confinata e vi influisce la temperatura del locale prima e dopo dello esperimento, e vi influisce anche il grado di rinnovamento dell'aria confinata durante il periodo dello esperimento stesso; *pertanto la semplice lettura dell'igrometro può portare a risultati fallaci*, e meglio è constatare la umidità dei locali con altri metodi..... »

Ora, prima di ogni altra cosa necessitava stabilire se il psicrometro come strumento per determinare l'umidità relativa dell'aria potesse ritenersi realmente un'istrumento preciso.

Il Rizzo (3) dice sul proposito che « è fuori di dubbio che l'incertezza delle determinazioni fatte dal psicrometro ha la sua causa in questo, che le costanti le quali compaiono nelle formule di riduzione non rimangono invariate, ma dipendono anzitutto, come avevano notato il Belli e il Regnault, dall'agitazione dell'aria che circonda lo strumento e dall'irradiazione variabile del calore. »

---

(1) Bollettino della Commissione speciale del municipio di Roma, 1888.
(2) Architettura sanitaria, Cap. V, p. 129.
(3) *Sulla misura dell'umidità atmosferica col psicrometro-ventilatore.* Nuovo Cimento, Serie IV, tomo VI, 1897, p. 241.

Nè usando il ventilatore come ora si pratica, secondo osservatori attendibili, diminuiscono le cause di errore.

Il Rizzo fatto notare che nonostante la ventilazione il calore raggiante può elevare la temperatura del termometro bagnato di 0°. 2, si domanda se in ogni caso e specialmente quando l'aria è più calda e più secca (ed è appunto allora che si manifestano le maggiori anomalie nel psicrometro) gli igrometri a condensazione del Regnault, e le semplici modificazioni dell'Alluard e del Chistoni, che vennero adoperate come igrometri campioni, diano sempre delle indicazioni così sicure che sopra di esse non possa cader dubbio, ecc.

Confrontando l'igrometro del Regnault nella forma datagli dal Chistoni con un igrometro molto più perfetto qual è quello del Crowa e confrontando lo stesso igrometro del Regnault modificato dall'Alluard con quello del Crowa, ne trae la conclusione che esso dà delle indicazioni molto sicure ed è perciò preferibile agli altri igrometri a condensazione: ha poi il grande vantaggio « che permette di studiare l'aria di un ambiente qualsiasi senza alterarla ».

Dippiù confrontando le presenti indicazioni di questo istrumento con quelle del psicrometro nelle condizioni in cui lo si adopera per le osservazioni metereologiche l'autore ha potuto concludere che l'umidità dell'aria nella gabbia meteorica in uso presso la meteorologia italiana, ove sono sensibilmente costanti le condizioni della trasmissione del calore per radiazione, può essere determinata col psicrometro applicando la formula:

$$F = F' \; 0.000749 \; H \; (t\text{-}t') + 0.0000000079 \; H^2 \; (t\text{-}t')^2$$

e che il psicrometro non è inferiore a nessuno dei migliori igrometri per esattezza e li supera di gran lunga per la semplicità e per il facile impiego.

Però anche ammesso che di questo istrumento ci si possa servire per gli usi meteorologici con una tal quale sicurezza, occorreva ancora vedere se potesse fornire in rapporto all'abitabilità delle case dei dati sui quali contare.

A tal uopo, ho praticato una serie di ricerche nell'appartamento già descritto, nell'Istituto e in altre case di costruzione recente e vecchie per risolvere i seguenti quesiti:

1° *Se il grado di umidità relativa che si deduce dalle indicazioni psicrometriche venga influenzato dalle condizioni meteoriche esterne a finestre e porte chiuse;*

2° *Se il grado di umidità relativa stia realmente in diretta dipendenza dell'umidità delle pareti;*

3° *Se si possa stabilire un grado di umidità relativa limite per l'abitabilità degli ambienti.*

La risoluzione di questi quesiti è intimamente legata frattanto alla tecnica usata per rilevare i dati psicrometrici.

Il Fiorelli dice: « terminata che sia la casa, e cioè capace di ricevere immediatamente gli inquilini, *si sceglie una giornata, quanto più è possibile, asciutta* per chiudere tutti gli appartamenti e camere in maniera, che per

quanto è possibile, l'ambiente interno non abbia comunicazione coll'aria esterna. La chiusura degli appartamenti e delle camere dura di consueto 48 ore; poi vi si accede coll'igrometro, avvertendo di entrarvi con sollecitudine e rinchiudendo immediatamente la porta. Ciò affinchè l'aria esterna non abbia campo di invadere l'ambiente chiuso e mescolarsi all'aria che vi è rimasta dentro imprigionata ».

Ed aggiunge: « la osservazione igrometrica io la fo a seconda delle diversità dei casi o camera per camera, o in quelle sole camere dell'appartamento che hanno diversa orientazione, cioè in una delle camere esposte a mezzodì, in una di quelle esposte a tramontana, siccome in una sola di quelle esposte a ponente o a levante ».

Condizioni indispensabili per praticare l'esame psicrometrico degli ambienti sono dunque:

1° Chiudere le finestre e le porte in giornate asciutte;

2° Tener chiusi gli ambienti per 48 ore.

Evidentemente dato il limite di 65 o meno concesso dal Fiorelli, per giornate asciutte bisognerà intendere quelle in cui l'umidità relativa sia inferiore o almeno uguale a queste cifre.

Ma quando occorrono per es. a Roma queste giornate?

Nel tempo che io praticai le mie ricerche cioè nel maggio, giugno e luglio (1ª decade), dicembre 1901 e nel gennaio-febbraio-marzo 1902 furono ben poche le giornate asciutte; infatti nè in gennaio, nè in febbraio 1902 si ebbero solo due giornate di seguito in cui l'umidità relativa si mantenne costantemente di sotto di 65: dovetti giungere al mese di marzo per trovarmi nelle condizioni cercate.

Nel mese di maggio 1901 solo una volta si ebbero due giornate di seguito ben asciutte e due volte una: dovetti aspettare il mese di giugno e di luglio per trovare parecchi di questi periodi. Nel dicembre 1901 non se ne trovò una, nel gennaio e febbraio 1902 si ebbero due sole giornate di seguito in cui l'umidità relativa si mantenne costantemente al di sotto di 65 (1).

Però il regolamento tace se, l'esame psicrometrico possa essere praticato quando pur essendosi chiuse finestre e porte, nel momento in cui l'umidità relativa esterna (della strada) è al di sotto o uguale a 65, subito dopo, l'umidità relativa esterna si elevi mantenendosi così più o meno al di sopra di 65; e tacendolo naturalmente lascia adito a potere praticare ugualmente l'esame.

---

(1) Ciò rilevo dai dati dell'Osservatorio del Collegio Romano, nei mesi in cui io praticai le ricerche suindicate, dai quali dati si può dedurre quante volte occorrono le giornate in cui l'umidità relativa rimase al di sotto di 65.

Del resto io, prima di praticare qualunque ricerca, ho sempre presa la umidità relativa all'esterno dell'ambiente da esaminare per assicurarmi che realmente anche in quel sito essa si mantenesse bassa.

Di guisachè il perito municipale può chiudere porte e finestre in momenti in cui l'umidità relativa è al di sotto di 65 e di tali momenti, nel decorso della giornata, durante i vari mesi ce ne sono molti (p. es., nel trimestre dicembre 1901-gennaio-febbraio 1902 se ne trovano circa 40).

Ma, per ottenere cifre paragonabili, tale pratica, potrebbe seguirsi, solo nel caso in cui le oscillazioni della umidità relativa negli ambienti chiusi, fossero indipendenti da quelle dell'umidità esterna.

Ora questa obbiezione non è, come a tutta prima potrebbe credersi, priva di valore; poichè risulta dalle ricerche da me fatte, che l'umidità relativa esterna, sia pure a finestre e a porte chiuse, influenza e non poco, quella interna, per cui, anche chiudendo in giornate asciutte gli ambienti, se, durante le prescritte 48 ore, l'umidità relativa si è di molto elevata, c'è il caso di esser costretti a dichiarare inabitabili ambienti che invece si sarebbero dichiarati abitabili ove l'umidità relativa esterna si fosse mantenuta bassa.

Sul proposito io credo di aver fatte delle ricerche esaurienti nell'appartamento sovra ricordato.

Notai anzitutto i seguenti gradi di umidità relativa; quando potei approfittare di giornate perfettamente secche e attendere che il cortile fosse perfettamente asciutto, dopo aver lasciato chiusi per 48 ore gli ambienti:

1ª Camera,	umidità	relativa	61
2ª Camera	»	»	61
3ª Camera	»	»	63
Corridoio ammezzato	»		63
Camera cortile	»		69
Corridoio sotterra	»		69
Camera di mezzo	»		67
Dispensa	»	»	68
Cortile	»		63 — 60 — 59
Strada	»		63 — 60 — 59

Ripetendo poi le osservazioni in periodi diversi, quando l'aria esterna presentava un grado di umidità relativa più o meno alto, trovai i dati esposti nella seguente tabella.

ESPOSIZIONE DELL'AMBIENTE	Umidità relativa dell'aria (rilevata col psicrometro)																	
	30 dicembre 1901			19 gennaio 1902			23 gennaio 1902			24 gennaio 1902			26 gennaio 1902			27 gennaio 1902		
	Interno	Strada	Cortile	Interno	Strada	Cortile	Interno	Strada	Cortile	Interno	Strada	Cortile	Interno	Strada	Cortile	Interno	Strada	Cortile
. . . .	..	75	82	..	80	89	..	72	86	..	84	88	..	82	86	..	44	82
1ª camera (esposta a sud)	80	..	..	78	..	..	78	..	..	73	..	..	81	..	..	70	..	..
2ª camera (esposta a sud)	80	..	..	78	..	..	78	..	..	73	..	..	82	..	..	70	..	..
3ª camera (esposta a sud)	84	..	..	78	..	..	78	..	..	73	..	..	82	..	..	71	..	..
4ª camera esposta a est (cortile) .	85	..	..	79	..	..	85	..	..	84	..	..	84	..	..	83	..	..
Corridoio esposto a nord (cortile).	80	..	..	79	..	.	85	..	..	84	..	..	84	..	..	83	..	..
Corridoio sotterra nord (cortile). .	87	..	..	82	..	..	79	..	..	—	..	..	81	..	..	79	..	..
Camera sotterra (esposta a sud) .	83	..	..	80	..	..	—	..	..	—	..	..	84	..	..	77	..	..

Ora questi dati psicrometrici, mentre mostravano come le camere anteriori, si diportassero analogamente, e l'aria confinatavi possedesse un grado di umidità relativa inferiore a quello del corridoio, dell'ammezzato, del sotterraneo delle camere del cortile, dicevano pure chiaramente che nel cortile il grado di umidità relativa, non andava parallelo a quello della strada mantenendosi sempre più elevato.

Questo fatto attrasse molto la mia attenzione epperciò mi proposi di studiare anzitutto il grado psicrometrico dell'aria del cortile a diverse altezze per vedere come variasse. Trovai così i dati seguenti:

DATA	Ore	Umidità relativa			
		Strada	Piano del cortile	1 metro dal pavimento	4 metri dal pavimento
27 gennaio 1902	15.5	44	83	81	44
. . . .	16	48	82	76	50

Ciò vuol dire che l'umidità del cortile impediva al psicrometro di notare una diminuzione dell'umidità relativa dell'aria del cortile stesso paragonabile a quella della strada. Soltanto ponendo lo strumento molto elevato dal suolo, l'equilibrio si trovava.

E questo fatto stava anche a significare che dopo giornate piovose anche se seguivano giornate asciutte prima che l'aria del cortile si equilibrasse in secchezza a quella esterna, necessitava un certo tempo, ciò che non poteva non avere un'influenza sul grado psicrometrico dell'aria del corridoio, e, almeno tenendo aperte le finestre di questo, su quello delle camere anteriori.

Approfittando allora delle giornate umide che si succedevano cominciai con fare le ricerche in questo periodo di tempo. Lasciai chiuse le finestre del corridoio per tre giorni, dopo dei quali presi il grado psicrometrico dell'aria delle camere anteriori, del corridoio, del cortile, della strada, trovai così:

Umidità relativa:

Camere anteriori	70
Corridoio ammezzato	76
Cortile	82
Strada	72

Aprii quindi le finestre del cortile, pur tenendo chiuse le porte delle camere anteriori e dopo 48 ore ebbi a notare che in esse l'umidità relativa dell'aria si elevava, tendendo a equilibrarsi con quella del corridoio, ossia con quella del cortile come si può vedere nella seguente tabella:

Tempo di osservazione	Umidità relativa			
	Cortile	Corridoio	Camere anteriori	Strada
Dopo 48 ore.	82	79	78	73

Quando potei approfittare di giornate asciutte che seguivano immediatamente a giornate umide, piovose, ripetei la prova venendo a trovare i seguenti dati:

Tempo di osservazione	Umidità relativa			
	Cortile	Corridoio	Camere anteriori	Strada
Subito.	80	79	71	55
Dopo 24 ore.	76	71	67	60
Dopo 2 giorni	73	69	67	63

Cioè l'umidità relativa delle camere anteriori veniva fortemente influenzata dall'evaporazione del cortile quando si tenevano aperte le finestre del corridoio, e ciò anche in tempi asciutti susseguenti a giornate piovose.

Ove quindi nel caso in ispecie io non avessi tenuto presente la difficoltà di evaporazione dell'acqua del cortile e l'influenza che il medesimo fatto esercitava sul grado di umidità relativa dell'aria del corridoio, a finestre chiuse e di quella delle camere anteriori, pure tenendo chiuse le porte di queste ultime, sarei stato condotto a dichiarare umidi gli ambienti.

Vi sono quindi delle condizioni locali estrinseche che possono far errare nel giudizio di abitabilità quando si vuole dedurre questo dal dato psicrometrico.

Vediamo ora se il criterio di abitabilità possa in tutti i casi essere legato al grado limite massimo di umidità relativa del 65 per cento come afferma in base alla sua esperienza il Fiorelli.

Ora, gli è certo, anche senza che adduca delle tabelle (tanto più che mi consta, essere venuto a queste conclusioni anche il collega S. Santori, direttore del Laboratorio bacteriologico municipale) che se nelle case vecchie e nuove bene asciutte, poste in luoghi elevati di Roma (Esquilino) realmente il grado igrometrico, preso in tempi

molto asciutti si mantiene sempre basso; non però altrettanto può dirsi nelle case poste in luoghi bassi come al Testaccio, e specialmente ai Prati di Castello, dove, spesso si trova grado igrometrico più alto.

Quando però si prenda in giornate in cui il grado dell'umidità relativa sia intorno a 65, non è difficile veder elevarsi negli ambienti anche se bene asciutti, indipendentemente dalla loro ubicazione, questa cifra di uno o più gradi sorpassando così il limite prescritto per l'abitabilità.

Nelle varie esperienze da me fatte in 4 ambienti all'Esquilino e in uno ai Prati di Castello, i dati forniti dal psicrometro dopo la chiusura delle camere mi hanno condotto a trovare l'umidità relativa superiore a 65, pur essendo gli ambienti abitati ed avendo l'apparenza di essere asciutti.

Oltre a ciò gli stessi ambienti chiusi quando l'aria esterna presentava un grado di umidità relativa elevata (sopra 75) hanno mostrato un grado di umidità non mai inferiore a 70: ma mai superiore a 80, e questo anche se l'umidità relativa esterna diveniva elevatissima.

Del resto, a voler giudicare dell'abitabilità di un ambiente dal solo dato dell'umidità relativa, e tanto più poi voler addurre un limite per l'abitabilità, senza tener conto nè dell'umidità assoluta o della temperatura, non mi pare giustificato.

Forse un limite si potrà indicare, quando sia stato fatto uno studio dal quale si stabiliscano prima entro quali confini di temperatura un ambiente, con una data umidità assoluta, possa dichiararsi abitabile; ma questo è tutto un lavoro che non mi risulta sia stato fatto.

Infine era da ricercare se il grado d'umidità relativa misurata col psicrometro dipende realmente, ad eccezione delle cause di errore sopra ricordate, dall'umidità delle mura.

Io per ora ho potuto fare soltanto esperienze a diversi intervalli di tempo in una camera dell'Istituto d'igiene, in cui una delle mura erasi imbibita da molti mesi d'acqua per lo sgocciolio continuo in seguito a rottura del serbatoio dell'acqua di consumo. Ricercai la quantità di acqua per cento della malta e il grado psicrometrico ottenendo i seguenti risultati:

MESI	Acqua % nelle malte	Umidità relativa dell' ambiente nelle 48 ore	Umidità relativa esterna nelle 48 ore	
			minima	massima
Maggio.	10.5	81, 83, 81	34	63
Giugno.	8.6	79, 75, 80	31	55
Giugno.	6.5	69, 67, 70	47	60
Giugno.	5.1	65, 63, 66	30	63
Luglio	4.91	63, 62, 62	35	64
Settembre	4.73	59. 57, 61	55	63
Settembre	4 71	61, 60, 63	55	64

Da dove si può rilevare (almeno nelle condizioni in cui io mi sono messo) come, pure le mura presentando una percentuale di acqua superiore al 4 per cento, l'umidità relativa saggiata dopo chiusura degli ambienti in giornate asciutte, si mantenne al disotto del 65 per cento.

Solo quando la percentuale raggiunse il 5 per cento chiudendo l'ambiente in giornate asciutte, il grado di umidità relativa si mantenne costantemente al disopra di 65, e mostrò evidentemente di essere influenzata dall'umidità delle mura.

Quindi, a mio avviso, parrebbe che il grado di umidità relativa misurato col psicrometro solo entro certi limiti, dipenda dall'umidità delle mura; poichè queste possono essere ancora molto umide e ciò nonostante, se la chiusura è fatta in giornate molto asciutte, può non venire raggiunto il limite tollerabile di umidità relativa del 65 per cento.

Concludendo, al metodo psicrometrico, così come si pratica ordinariamente, per giudicare dell'abitabilità delle case, mi pare si possa attribuire solo un valore relativo e che in ogni caso debbano tenersi presenti le eventuali cause intrinseche ed estrinseche che possono influenzare erroneamente i dati da esso forniti.

Del resto questo metodo, ha poi il grave inconveniente di non essere controllabile poichè è ben raro potersi mettere costantemente nelle stesse condizioni di ricerca (di umidità relativa esterna ed interna) qualora le prove si ripetano, per cui il proprietario degli immobili è costretto a sottostare al giudizio dei periti anche quando creda che essi siano caduti in errore. Epperò a mio avviso, non foss'altro per questo dovrebbe essere abbandonato.

Del resto, ove, pur attenendosi alle norme regolamentari, si scelgano per la chiusura degli ambienti giornate asciutte e non vi

siano cause locali intrinseche ed estrinseche che possano far variare l'umidità relativa, è certo che, questa, solo per il fatto delle inevitabili variazioni di temperatura nell'ambiente, si modificherà, e ciò anche se rimane immutata la quantità di acqua nell'aria dell'ambiente.

Solo tenendo conto dell'umidità assoluta, questo fatto può essere accertato, per cui, a mio avviso, sarebbe consigliabile indicare o l'umidità relativa e la temperatura a cui si è fatto l'esame, o addirittura accanto l'umidità relativa anche l'assoluta, e ciò tanto al momento della chiusura degli ambienti, quanto dopo le 24-48 ore (1).

B). Metodi chimici.

Per stabilire l'umidità degli ambienti sono stati proposti procedimenti chimici, diretti a stabilire il per cento di acqua o nell'aria degli ambienti, o nell'aria dei muri, ovvero il contenuto in acqua delle malte, ecc.

1. *Procedimenti chimici per valutare l'abitabilità degli ambienti dell'aria da essi racchiusa.*

a) Il procedimento che viene generalmente citato,, è quello del Marc d'Espine (2), consigliato dal Mantegazza.

Si prendono 500 gm. di calce viva ben secca e si lascia nell'ambiente, a porte e finestre chiuse per 24 ore; quindi si toglie e si ripesa. Se havvi un aumento in peso non superiore ai due grammi, la casa si dichiara abitabile in caso contrario no.

Per quanto apparentemente semplice, questo procedimento nella pratica, presenta molti inconvenienti.

Anzitutto, bisogna trasportare in barattoli ben asciutti della calce viva secca ben pesata, ciò che importa un lavorio preparatorio non piccolo; poi in sito, bisogna per quanto ho potuto constatare, disporla sopra una superficie ampia e quindi toglierla dal barattolo per rimetterla dentro dopo le 24 ore. Operazione assolutamente impossibile a farsi senza lasciarne tracce più o meno grandi nel recipiente in cui è stata sparsa.

---

(1) Si potrebbe anche invece di indicare lo stato igrometrico in centesimi di umidità relativa, adoperare la cifra indicante il *deficit di saturazione*: si avrebbe così una *espressione quantitativa* esatta del vapor acqueo mancante per la completa saturazione. Supponiamo per es., 4 ambienti nei quali la temperatura sia eguale a 15° C. e le rispettive umidità relative di 60, 70, 80, 90: invece di queste cifre potrebbero adoperarsi i rispettivi *deficit di saturazione* 5, 12; 3, 84; 2, 56; 1, 28. Praticamente però si acquista una nozione più chiara dello stato igrometrico quando questo è indicato in centesimi di umidità relativa, perchè, a parità di condizioni di temperatura, le differenze fra le umidità relative di parecchi ambienti paragonati tra loro sono sempre maggiori e quindi più facilmente rilevabili delle differenze esistenti tra i corrispondenti valori dei *deficit di saturazione*.

(2) *Ann. d'Hygiène*, 2ª serie, 1855; è riportato da tutti i trattatisti.

Chi poi avesse da fare esami di molti ambienti e in un tempo limitato come accade spesso nelle grandi città è materialmente impossibile limitare il tempo di esposizione della calce all'aria alle prescritte 24 ore, e perciò, si finisce col farla stare di più o di meno.

Oltre a ciò questo metodo ha il grave inconveniente come quello psicrometrico, di non potersi praticare quando vengano chiusi gli ambienti in giornate non perfettamente asciutte e di dare risultati non corrispondenti al vero quando pur rimanendo chiuso l'ambiente l'umidità relativa esterna viene ad elevarsi.

Ho provato a renderlo più pratico portando negli ambienti da esaminare delle vaschette contenenti 20-25 grammi di calce dopo averle tenute precedentemente in istufa a 100 e chiuse ancora calde con tappo a smeriglio, pesandole appena raffredate. Queste capsule scoperchiavo poi nell'ambiente da esaminare e poi dopo 24-30-36-48 ore le richiudevo, riportavo in laboratorio e pesavo. Le cifre che ottenni furono però così irregolari da farmi presto abbandonare questo metodo sicchè non credo di dovervi insistere ulteriormente sopra.

b) Un metodo molto più esatto consisterebbe nell'uso *dell'igrometro chimico;* ma, il maneggio di questo procedimento è inadatto allo scopo, come lo è per la meteorologia. Per dirla col Palazzo « a causa della complicata manipolazione e dei calcoli che richiede, è disadatto per le ordinarie osservazioni meteorologiche. Vi si ricorre ogni qualvolta si tratta di ricerche speciali che esigono grande precisione, ovvero quando si tratta di controllare le indicazioni di altri igrometri meno esatti (1) ».

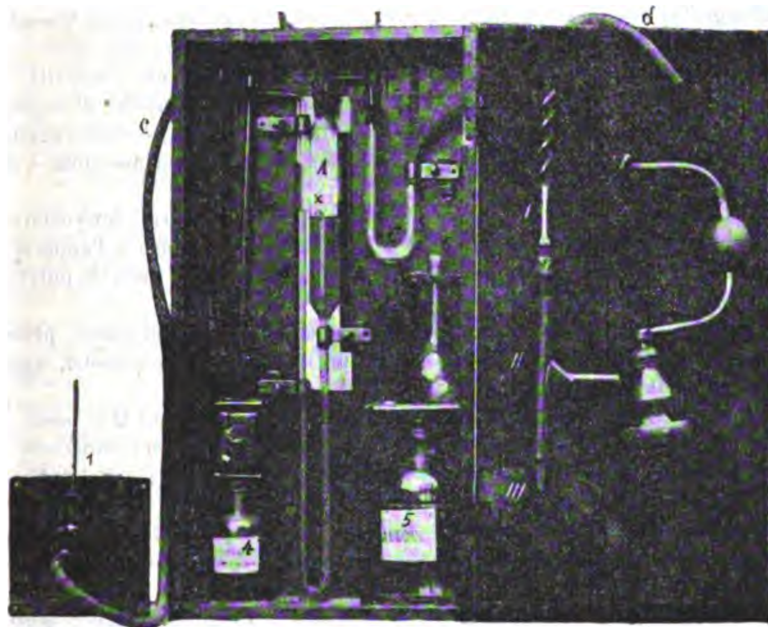
c) Ho quindi tentato di sostituire a questi altri metodi più alla mano. A tal uopo ho pensato di far gorgogliare l'aria di un ambiente, tenuto chiuso per 24 ore in giornate non molto umide (umidità relativa esterna da 65 a 70) in un recipiente contenente alcool a densità nota, sino ad avere aspirati, a mezzo di un aspiratore (in cui l'acqua veniva sostituita con l'olio) 20 litri d'aria in 1 ora. Dopo questo tempo risaggiavo la densità dell'alcool e poi tenendo presente la cubatura dell'ambiente, deducevo per mezzo di opportuni calcoli la quantità d'acqua per cento contenuta nell'aria dell'ambiente stesso.

Questo procedimento, avendomi dato discreti risultati (quantunque io sia per esperienza poco propenso a dedurre l'abitabilità dall'esame dell'aria degli ambienti), ho studiato la forma più opportuna da dare all'apparecchio e il mezzo di renderlo di pratica attuazione.

---

(1) Lezioni di fisica applicata all'igiene, 1891.

Ho così costruito un apparecchio (fig. I) costituito da un tubo ad **U** alto cm. 40 di cui una delle branche verso la metà si slarga in un recipiente cilindrico (*A*) della capacità di cmc. 70. La branca più sottile (*B*) è piegata ad angolo e si innesta col tubo di gomma (*C*) da cui si aspira l'aria del muro. La branca più grossa è chiusa da un tappo di gomma (*b*) forato che porta un tubo di vetro, il quale per mezzo di un tubo di gomma (*d*) (intramezzato da un tubo (*c*) ad **U** pieno di cloruro di calcio) si mette in comunicazione con l'aspiratore.



(Fig. I).

Questo apparecchio è fissato con appositi sostegni a vite (i quali permettono facilmente di smontarlo) al fondo di una cassetta nella quale trovano posto la boccia dell'alcool assoluto (5) una boccia di una soluzione alcoolica satura di cloruro di cobalto (4), una scatolina contenente galleggianti per l'alcool che ha densità 99° e quelli per la densità dell'alcool quando abbia assoluto 2 °/₀ e 3 °/₀ d'acqua; due pipette (2), divise a decimi di cmc., e poi un palloncino tarato (6) della capacità di 50 cmc.

Per far funzionare l'apparecchio giunti in sito, si versano nel palloncino tarato cmc. 2. 5 della soluzione alcoolica di cloruro di cobalto (*), poi si ag·

(*) Dalle ricerche fatte mi risulta che facendo soluzione a 20°-25° C: 1° prendendo, alcool a 99°-99°. 5 cmc. 98, soluzione alcoolica di cloruro di cobalto cmc. 2; quando il colorito diviene violetto-ametista, vuol dire che

giunge tanto alcool assoluto sino a che si porta il volume del liquido a 50 cmc., naturalmente tenendo conto della temperatura a cui si opera. Si versa quindi tutto l'alcool nella branca (*A*) più larga dell'apparecchio levando il tappo di gomma che rapidamente si rimette a posto. Intanto prima di fare questa operazione entro alla stessa branca si pongono due galleggianti (X e X_1), rispettivamente adatti a segnare la densità che assume l'alcool a 99° quando ha estratto l'acqua dal muro le cui malte ne contengono il 2 e 3 °/₀. Ciò fatto si mette in funzione l'aspiratore. Se prima di passare i 20 litri d'aria aspirati dall'aspiratore, il colore della soluzione alcoolica che è celeste-bleu, diventa ametista, si interrompe l'aspirazione per vedere quale dei densimetri galleggi: se nessuno dei due o il più pesante, si continua ancora. Terminata l'aspirazione dei 20 litri, se galleggia solo il galleggiante già detto e non l'altro e l'alcool ha una colorazione ametista vuol dire che l'umidità della malta del muro sta tra il 2 °/₀ e il 3 °/₀, se galleggia anche il secondo e l'alcool ha una tinta ametista rosea vuol dire che il 3 °/₀ è stato raggiunto. Se poi l'alcool assume una tinta rosea ben netta l'acqua assorbita è assai più del 3 °/₀.

Per il buon funzionamento dell'apparecchio è necessario intercalare tra il tubo di gomma che lo mette in comunicazione col muro e l'apparecchio stesso una bolla di vetro piena di ovatta per trattenere tutto il pulviscolo che intorbiderebbe facilmente l'alcool.

Dippiù è necessario, quando siano passati tutti i 20 litri d'aria, prima di osservare definitivamente la posizione che prendano i densimetri, aggiungere tanto alcool assoluto, quanto è quello evaporato.

A tal uopo lateralmente alle due branche del tubo ad **U** è posta una scala (*a*) con un indice. Quando si è versato l'alcool si fa combaciare l'indice a quel segno che corrisponde al menisco del liquido sia nel tubo slargato, che nel tubo sottile.

È facile quindi ad operazione finita con le pipette divise a decimi di cmc. aggiungere tanto alcool quanto è necessario per riportarlo al volume primitivo.

Naturalmente cause di errore e non poche rimangono sempre: però mi sono accorto che la maggior parte di esse non influenzano sensibilmente il

---

l'alcool ha assorbito il 2.5-3 °/₀ d'acqua; se passa al roseo vuol dire che l'alcool ha assorbito più del 3 °/₀.

2° prendendo, alcool a 99°-99°.5 cmc. 99, soluzione alcoolica di cloruro di cobalto cmc. 1; quando il colorito diviene ametista l'acqua assorbita è uguale all'1.5 °/₀, la tinta ametista-rosea indica che essa è uguale al 2 °/₀, e quella rosea sopra il 2.5 °/₀.

3° prendendo, alcool a 99°-99°.5 cmc. 99.5, soluzione alcoolica satura di cloruro di cobalto 0.5: quando la tinta diviene ametista l'alcool ha assorbito già l'1 °/₀ d'acqua, quando diviene ametista-rosea ha assorbito l'1.5 °/₀, quando diviene rosea il 2 °/₀.

Di queste tre soluzioni va prescelta l'ultima, e bisogna farla volta per volta, adoperando soluzioni alcooliche di cloruro di cobalto, recenti, e tenute in bottiglie ben tappate di vetro colorato, altrimenti si altera e non serve più allo scopo. Dopo un mese, per esempio, ho trovato che per ottenere la colorazione rosea quando l'alcool ha assorbito il 2 °/₀ d'acqua, bisognava prendere cmc. 95 di alcool e aggiungere 5 cmc. della soluzione di cloruro di cobalto.

modo di contenersi nè dei densimetri, nè la colorazione del liquido (1). Esse avrebbero però molta importanza ove si volesse conoscere la densità assunta dall'alcool nella frazione di grado intermedio dal 2 al 3. Ho cercato anche di tener conto della temperatura, ma ho veduto che nei limiti ordinari, le sue oscillazioni non hanno alcuna influenza apprezzabile. Ho anche complicato un po' più l'apparecchio facendo in maniera di poter sopprimere il travaso dell'alcool dalla boccia nel pallone tarato e da questo nell'apparecchio.

A tal uopo metto l'alcool in un separatore di vetro fornito di un rubinetto nel collo e questo collo introduco nel tappo di gomma che chiude la branca (*A*) larga dell'apparecchio. Questo tappo di gomma viene allora a portare due fori, uno per il separatore e l'altro per il tubo (*C*) che lo mette in comunicazione con l'aspiratore.

Il separatore che uso è poi graduato in cmc., per cui aprendo il rubinetto posso benissimo far pervenire nell'apparecchio i 50 cmc. di alcool voluti e ad operazione finita aggiungere quella quantità che è evaporata. Per colorare l'alcool con la soluzione di cloruro di cobalto l'aggiungo nelle proporzioni stabilite al volume dell'alcool contenuto nel separatore.

Finita l'operazione, per saggiare la densità dell'alcool, si fa assai rapidamente. Bisogna però prima innestare nella curva dell'U dell'apparecchio, un tubo a T fornito di un rubinetto. Aprendolo si fa pervenire il liquido nel recipiente cilindrico ove viene immerso il densimetro cercando di ottenere rapidamente l'equilibrio.

Unico inconveniente che rimane qui da evitare è l'ultimo contatto dell'alcool coll'aria, mentre se ne cerca la densità: però attesi i risultati che può dare il metodo, non vale la pena di farne quel conto che a tutta prima potrebbe credersi. Certo per essere sicuri è sempre meglio ripetere due volte la prova, usufruendo in due tempi diversi dell'alcool contenuto nell'apparecchio, che è sempre in quantità tale da permettere di rifare la prova.

Questo apparecchio ha i seguenti vantaggi:

1° Si può far funzionare, una volta messo a posto, senza bisogno di rimanere sempre nell'ambiente, facendo passare il tubo dell'aspiratore da un foro praticato nella porta.

2° Si può senz'altro stabilire se la quantità dell'acqua assorbita sia inferiore al 2 % o superiore, sia dal colorito assunto dall'alcool, sia osservando la posizione presa dai densimetri che servono rispettivamente a indicare la densità dell'alcool che abbiano aspirato aria da mura fatte con malta contenente il 2 % e il 3 %.

Però presenta sempre l'inconveniente di non indicare con esattezza la quantità di vapore acqueo dell'aria, di non funzionare senza un aspiratore, ossia senza un apparecchio di trasporto non

---

(1) Per es. l'alcool si evapora, a una densità superiore a quello che si aggiunge e quindi alla fine dell'esperienza, le densità che si ottengono, non sono le reali; però si tratta di variazioni per frazioni piccolissime di grado, assolutamente trascurabili.

facile e comodo e di non potersi far funzionare che in ambienti chiusi in giornate asciutte da non meno di 24 ore. Dippiù ove si debbano nello stesso tempo esaminare numerosi ambienti, l'operazione diventa lunga, poichè l'aspiratore deve impiegare non meno di un'ora per aspirare i 20 litri se non si vuole che l'aria gorgogliando rapidamente nell'alcool lo faccia evaporare in gran parte o magari entrare nel tubo di aspirazione e molta acqua non venga trattenuta (1).

2. *Procedimenti chimici per giudicare dell'abitabilità di un ambiente dall'umidità dell'aria aspirata dalle mura.*

a) Di procedimenti aventi questo scopo veramente può dirsi che non esisteva che quello del Fortunato. Esso consiste (per usare le parole del Palazzo) nell'introduzione di una canna di ferro entro al muro a diversa profondità; dentro la canna gioca una punta di acciaio, la quale munita all'esterno di un manubrio che si fa girare a mano, trivella a poco a poco il muro; il vano del foro così praticato è, o almeno dovrebbe essere a tenuta d'aria, occupato dalla canna. Una volta operato il foro, si estrae la punta perforatrice, e con un semplice meccanismo, la canna vuota resta messa in comunicazione con una pera di cautciu, ovvero con una piccola pompa con la quale si aspira l'aria del muro. Quest'aria così aspirata e carica dell'umidità proveniente dal materiale di muratura, prima di giungere alla pera di cautciu od alla pompa è costretta a passare su cartoline azzurre preparate col cloruro di cobalto. Si capisce come dal cambiamento di colorazione avvenuto nelle cartoline e dal volume d'aria passata (che si può facilmente determinare dal numero delle volte che si è messo in moto lo stantuffo della pompa) è possibile giudicare del quantitativo di umidità dell'acqua del muro in esame. » Dopo questa descrizione il Palazzo aggiunge però: « l'idea del metodo è in sè semplice ed ingegnosa; ma in pratica non si si mostra esente da inconvenienti, specialmente perciò che riguarda l'esatta perforazione del muro, impedendo all'aria esterna qualsiasi comunicazione con la canna. »

Ma v'ha dippiù: dopo un certo numero di litri d'aria aspirata, se la cartina cambia colore, non si sa quanta sia l'acqua contenuta nell'aria aspirata, se compatibile coll'abitabilità o no, dimodochè è un procedimento assolutamente da scartarsi.

b) Io ho cercato di applicare il mio *metodo all'alcool* per l'esame dell'umidità dell'aria degli ambienti, a quella dei muri.

A tal uopo posi speciale attenzione nel costruire un apparecchio fissabile al muro, che non permettesse l'entrata dell'aria esterna.

---

(1) Intercalando tra l'aspiratore e l'apparecchio qualche tubo a cloruro di calcio pesato, ci si può assicurare, nei casi dubbi, se alla fine della operazione tutta l'acqua è stata trattenuta dall'alcool poichè risulta da alcune ricerche comparative da me fatte, che ciò non è così agevole ad ottenersi come a tutta prima si potrebbe credere.

Usai quindi (fig. I) dei tubi metallici (*1*), saldati verso la metà della loro lunghezza al foro di una piastra metallica fornita di buchi ai quattro angoli.

Questi tubi si fissano al muro nel quale precedentemente si pratica un foro con una trivella e per fissarli si avvolge una porzione di tubo che deve entrare nel buco con mastice Archanson piuttosto denso (sciolto e lasciato intiepidire) col quale si bagna pure bene la faccia corrispondente della piastra metallica, e che si fissa definitivamente con chiodi che si fanno passare per i buchi che si trovano ai suoi angoli.

Alla porzione del tubo rimasto fuori si adatta poi il tubo di gomma, se già non si è fatto prima, e lo si mette in comunicazione con l'apparecchio.

Ho poi anche perfezionato questo tubo-piastra d'attacco al muro, facendo la parte esterna più ampia, fornendolo in alto di una apertura cerchiettata in cui si può introdurre un tappo di gomma attraversato dal bulbo di un termometro, e in basso di una apertura più piccola fornita di un coperchietto a vite con disco di gomma per la chiusura ermetica, allo scopo di svuotare il contenuto del cilindro nel caso vi entrasse polvere o altro.

Dopo messo a posto la piastra, si lascia stare una mezz'oretta e poi si mette in funzione l'apparecchio.

Dalle esperienze fatte, parmi si possa dedurre che, se dopo il passaggio di 20 litri d'aria, il liquido bleu non assume colorazione ametista e il galleggiante che segna la densità del 2 per cento non affiora, gli ambienti siano abitabili.

Però questo procedimento continua ancora ad essere alquanto incomodo sia perchè occorre adattare ai muri la placca che, volere o no, imbratta il muro e rovina le tappezzerie se si deve fare l'esame in case già abitate, sia perchè rimane sempre la questione dell'uso dell'aspiratore, che fa impiegare molto tempo e rende il metodo lungo.

Con tutto questo, io lo ritengo superiore al metodo psicrometrico, poichè si può in ogni momento procedere all'esame indipendentemente dalla chiusura degli ambienti e perchè fino ad un certo punto è controllabile.

3. *Procedimenti per giudicare dell'abitabilità degli ambienti dalla quantità di acqua contenuta complessivamente nei materiali di cui si compongono le pareti e specialmente nella malta* (1).

---

(1) Faccio notare che a bella posta ho detto *quantità di acqua contenuta complessivamente nei materiali di cui si compongono le pareti* e non di *acqua*

Questi procedimenti non sono molto numerosi, ma per contrario controllati e studiati da vari antori, per cui è ormai possibile dare un esatto giudizio su di essi.

Le prime ricerche fatte sono state dirette a trovare il modo di prelevare le medesime con adatti strumenti.

Si è usato dapprima lo scalpello e il martello: ma poi il Tursini ideò la sua trivella, che realmente è la più comoda.

Nell'adoperare questo strumento, ho però dovuto accorgermi che è parecchio incomoda la sua forma di semplice trivella. E quindi ho preferito usare il sostegno-trapano da falegname (fig. I), senza incanalare la trivella-trapano nell'astuccio di ottone. Poggiando sul petto il pomo del trapano, si fa agire con la mano destra la trivella e si raccoglie il materiale che fuoriesce in una boccia a tappo smerigliato a larga apertura che si tiene con la sinistra al di sotto del buco che si va facendo. Acciocchè poi non vada perduto del materiale, io uso un imbuto a largo collo che introduco nella bottiglia: quest'imbuto ha la parte svasata, appiattita da un lato in maniera da poterla far combaciare col muro al di sotto del buco stesso.

a) Comunque raccolto il materiale, un primo metodo usato è quello del Tursini (1) stesso:

Esso consiste nel pesare 10 cgr. di tufo, porli in un bicchiere contenuto in un involucro di legno, e poi versarvi dentro 10 cmc. di acido solforico a 66°. Il materiale si mescola adoperando il bulbo di un termometro graduato da 0° a 150° e frattanto si legge la temperatura segnata dal termometro. Ogni elevazione di temperatura corrispondente a 2°,5 C., corrispondono all'1 per cento circa di malta prosciugabile. L'autore ritenne abitabile quell'ambiente le cui malte mescolate all'acido solforico danno una elevazione di temperatura poco più diversa da quelle che si ottengono mescolando uguale quantità di tufo, essicato all'aria.

Il metodo del Tursini non può però essere applicato in tutti i luoghi e in tutti i paesi perchè non in tutti si fabbricano le case col tufo come a Napoli, quindi non ho creduto opportuno di controllarlo.

b) In questi ultimi tempi poi sono stati adoperati i cosidetti *metodi all'alcool.*

L'idea di sottrarre coll'alcool l'acqua alla malta (!) si deve al Markl (2). Questi pone 10-50 gr. di malta in 150 cm. di alcool a 98-99 a una data temperatura,

---

contenuta nelle malte, perchè quando si raccolgono i campioni di queste ultime, generalmente si preleva dell'intonaco, della malta, e anche, specie dove quasi tutte le case sono fabbricate con mattoni, parte di questi. In alcuni casi poi si aggiunge del tufo, come succede a Roma, dove questo viene adoperato insieme o in sostituzione degli altri materiali.

(1) *L'umidità delle case di nuova costruzione a Napoli.* Riv. Igiene e San. Pubbl. 1891.

(2) *U. eine neue Methode z. Bestimmunng der Mauerfeuchtigkeit.* Archiv. f. Hygiene Bd. 34. 1899 e Bd. 38. 1900.

agita e filtra: dell'alcool filtrato saggia poi nuovamente la densità. Dopo di che con un calcolo semplicissimo, che è inutile stare a riportare si può risalire al °/₀ di acqua contenuta nella malta.

Questo procedimento è stato controllato dallo stesso Markl col metodo di Glässgen di fronte al quale avrebbe trovato che dà delle cifre bensì più forti, ma che la differenza non superando mai il 0. 1 per cento, l'errore nella pratica è trascurabile.

Però il metodo del Markl è stato subito oggetto di critiche in base a dati teorici e sperimentali.

Il De Rossi dice: « Il poco valore pratico del metodo, così come è stato eseguito dall'autore, viene dimostrato dai risultati che egli stesso ci espone confrontando il suo metodo con quello di Glässgen ed ottenendo nei tre soli saggi che contenevano piccole quantità di acqua, differenze per niente affatto trascurabili. Risultati più esatti ottiene naturalmente in malte contenenti forti quantità di acqua (dal 25 all'11,5), ma è appunto in questi casi che è meno necessario un alto grado di esattezza. Due sono evidentemente i punti deboli del metodo. La filtrazione ripetuta e prolungata all'aria libera di un alcool quasi assoluto e quindi avidissimo dell'umidità atmosferica, costituisce una prima causa di errore; inoltre appare evidentissima la difficoltà delle due determinazioni densimetriche inquantochè il calcolo della quantità di acqua contenuta in malte non eccessivamente umide dovrebbe fondarsi sull'esatto apprezzamento di differenze di pochi decimi di grado alcoolimetrico. »

Del resto accanto a quelli che non sono fautori del metodo del Markl ve ne sono però alcuni che sono favorevoli ad esso come per es. il Marjetzki (1). Questi avrebbe constatato differenze in comparazione al metodo di Glässgen oscillanti fra 0,1 °/₀ e 0,5 °/₀ in più o in meno, le quali però condurrebbero a commettere un errore che non può pesare sul giudizio dello stato sanitario degli ambienti.

c) Il De Rossi (2), ha tentato di modificarlo e di renderlo più semplice ed esatto, cercando sovratutto di evitare le letture densimetriche troppo delicate ed ingannevoli e di far rimanere l'alcool in contatto con l'aria esterna. Perciò egli trascurando la determinazione della quantità di acqua contenuta nella malta si è contentato di ricercare se essa oltrepassi o no un dato limite da ritenere come tollerabile (l'1. 50 per cento).

A tal uopo pensò di impiegare due piccoli densimetri che costrusse da sè, i quali avevano rispettivamente le densità dell'alcool a 98°. 8 e 98°. 1 all'incirca (alla temperatura di 15° C.), estremamente sensibili a piccolissime variazioni delle densità dei liquidi in cui sono immersi. Per la densità del secondo galleggiante l'autore stabilì ancora che bastava aggiungere a

---

(1) *Valeur du procédé de Markl pour l'appréciation de l'humidité des murailles* (Journ. de le Soc. russe d'Hyg. pub. 1901, n. 55 p. 305. Rif. Revue d'Hygiène, 1901, pag. 1019).
(2) loc. cit. pag. 185.

100 cmc. di alcool, cmc. 0.74 di acqua distillata, sempre alla temperatura di 15°, e per mezzo di un semplice calcolo, potè stabilire che se 40.5 cmc. di alcool di densità uguale al primo galleggiante si aggiungono a 20 grammi di malta, a seconda che il liquido filtrato avrà una densità inferiore o superiore a quella del secondo galleggiante, si potrà stabilire se la malta contenga meno o più di 1.50 per cento di acqua libera.

A tal uopo egli versa i 20 grammi di malta pesati coll'esattezza del centigrammo in un comune separatore, dopo avervi nel fondo posto della lana di vetro, poi aggiunge 40.5 cmc. di alcool, chiude e sbatte bene per 4-5 minuti. Indi applica all'apparecchio una pera di gomma coll'intermezzo di un tubo contenente cloruro di calcio, apre il rubinetto del separatore, e facendo pressione sulla pera costringe l'alcool a filtrare attraverso alla malta e alla lana di vetro, raccogliendolo in una provetta sottostante unita al collo del separatore a mezzo di un tappo di gomma forato: è in questo secondo recipiente che si trova il secondo galleggiante. Quando è filtrata una sufficiente quantità di alcool distacca la provetta, la chiude e la immerge in un bagno a 15° (il che non è sempre necessario) e osserva se il densimetro galleggia o no, e da ciò deduce se il contenuto d'acqua della malta rimane o no al disotto del limite voluto.

L'autore dopo averlo esperimentato in confronto col metodo di Glässgen, conclude col dire che si è convinto che esso è capace di fornire risultati notevolmente e costantemente esatti, avendone ricavate indicazioni precise con saggi di malta contenenti l'1.30, 1.40, 1.46, 1.55, 1.60, 1.64 %, ecc., di acqua libera.

A questo procedimento, ad ogni modo, sono state mosse delle critiche tecniche, come a quello del Markl. Lo Spataro (1) dice per esempio: « i due metodi, partono dal concetto che la densità dell'alcool sia proporzionale alla quantità di acqua che esso contiene, il che è notoriamente inesatto, perchè la quantità di alcool che si trova nell'acqua non è proporzionale alla quantità di acqua che vi si aggiunge; l'errore è tanto maggiore in quanto che si pecca in meno. Altra causa d'inesattezza potrebbe essere la dissoluzione nell'alcool dei sali contenuti nella malta, per cui si potrebbe scambiare per acqua dovuta all'umidità, l'acqua di cristallazione necessaria ai vari composti della malta stessa ».

Il De Rossi però (2) ha fatto rilevare che queste obbiezioni, non hanno quel valore che a prima vista si crederebbe. Per la prima si riferisce al lavoro del Markl e al suo da cui risulta che gli ordinarii componenti della malta hanno un coefficiente di solubilità nell'alcool assolutamente trascurabile. Per la seconda, l'A. dimostra che non può affatto riferirsi al suo metodo.

Io senza preoccuparmi delle critiche tecniche mosse al metodo ho rivolto la mia attenzione a controllare se le malte che ci mostravano contenere l'1 per cento, l'1.50 per cento, il 2 per cento, secondo il metodo del Glässgen, trattate col procedimento del De Rossi, rivelassero un contenuto di acqua diverso ed ho subito ve-

(1) L'Ingegneria Sanitaria. Torino 1899, p. 212.
(2) Idem, ibidem, p. 231.

duto che per ottenere buoni risultati è assolutamente necessario costruire densimetri estremamente sensibili (il che non è troppo facile e non riesce che dopo un certo numero di prove) e poi occorre non tenere l'alcool in grosse bocce da cui prelevare la quantità che serve, volta per volta, perchè in breve varia la sua densità e quindi si commettono degli errori (1).

Frattanto ecco i risultati che ho ottenuti:

Malte contenenti acqua %	Posizione presa dal secondo galleggiante nell'alcool filtrato, alla temperatura di 15°
0.9721	Rimane al fondo.
0.9931	id.
1.0004	id.
1.0571	id.
1.0970	id.
1.2740	id.
1.2980	id.
1.3210	Viene a galla e poi torna al fondo.
1.3778	id.
1.3993	id.
1.4005	id.
1.4101	id.
1.4229	id.
1.4520	id.
1.4728	Viene a galla e lentamente torna al fondo.
1.4933	id.
1.4971	id.
1.4997	id.
1.5004	id.
1.5321	Viene a galla e vi rimane.
1.5532	id.
1.5724	id.
1.5871	id.
1.5972	id.

dove si vede che, quando si è riusciti a fabbricare un densimetro, che sia veramente sensibile, il metodo del De Rossi, regge al confronto con quello del Glässgen. Se c'è una diversità, sta in questo: il galleggiante tende a rimanere a galla nell'alcool che ha trattate malte contenenti un po' meno dell'1.50 per cento di acqua; ma, questo inconveniente si ha soltanto quando l'alcool ha trattato malte con un per cento di acqua vicinissimo all'1.50 per cento, per esempio coll'1.47-1.49, ecc., quindi l'errore che si commette,

(1) Cfr. De' Rossi. *U. eine neue Methode z. Bestimmung d. Mauerfeuchtigkeit.* Arch. f. Hygiene, Bd. 37 p. 275 nota.

a mio avviso, non supera il 0.1 per cento, come vide il Marjetzi per il metodo del Markl.

Per l'esattezza dei dati è però necessario badare al tempo in cui l'alcool rimane in contatto con la malta. Adoperando infatti malte contenenti la stessa quantità di acqua e tenendo in contatto con essa l'alcool per vario tempo ho trovato:

N. dei saggi	Quantitativo o/o di acqua nelle malte	Posizione del galleggiante col metodo del De Rossi dopo contatto dell'alcool colle malte		
		2 minuti	5 minuti	10 minuti
1°	1.5973	Non galleggia	Viene a galla e poi va a fondo	Galleggia
2°	1.5971	Id.	Id.	Id.
3°	1.5967	Id.	Non galleggia	Id.

dove si vede che per essere sicuri di ottenere risultati costanti è necessario sbattere l'alcool con la malta più di cinque minuti.

Inoltre la lana di vetro da adoperare deve essere scelta opportunamente (per esempio quella a fili lunghi è assolutamente inadatta) e opportunamente compressa, altrimenti l'alcool che filtra rimane torbido e quindi l'esperienza va a monte (1).

Ne è a credere che ripigliando l'alcool e poi filtrandolo ancora vi si possa rimediare, perchè allora bisogna intercalare nel procedimento dei travasi in contatto con l'aria esterna che, naturalmente alterano la densità dell'alcool e conducono ad errori non piccoli.

Un'altra condizione, che implica un po' di manualità, sta poi nel fare pressione con la pompetta di gomma per far filtrare l'alcool attraverso la malta e il filtro di lana di vetro, senza far saltare via il tappo di gomma, per cui l'alcool viene subito a contatto con l'aria esterna. Bisogna quindi durante l'esperimento tenere con la mano destra fisso il tappo di gomma all'apparecchio e non dimenticarsene mai.

Vi sono poi altri inconvenienti dipendenti dalle malte. Ho trovato infatti una volta che 20 grammi di una malta appena aggiunti dell'alcool si rigonfiavano e si trasformavano in una poltiglia, da cui era ben poco l'alcool che si poteva ricavare: per fortuna però l'inconveniente è raro a riscontrarsi, e sempre che si trovi, trattasi di malte con una minima quantità di acqua.

Inoltre, per ottenere risultati assolutamente esatti è necessario che, volta per volta, l'apparecchio venga ben asciuttato, dopo lavato con alcool e che la lana di vetro che si adopera venga prima essicata in un essicatore.

(1) Per questa ragione io credo che alcuni autori abbiano trovato applicando il metodo originale del Markl che l'alcool alcune volte filtrava torbido.

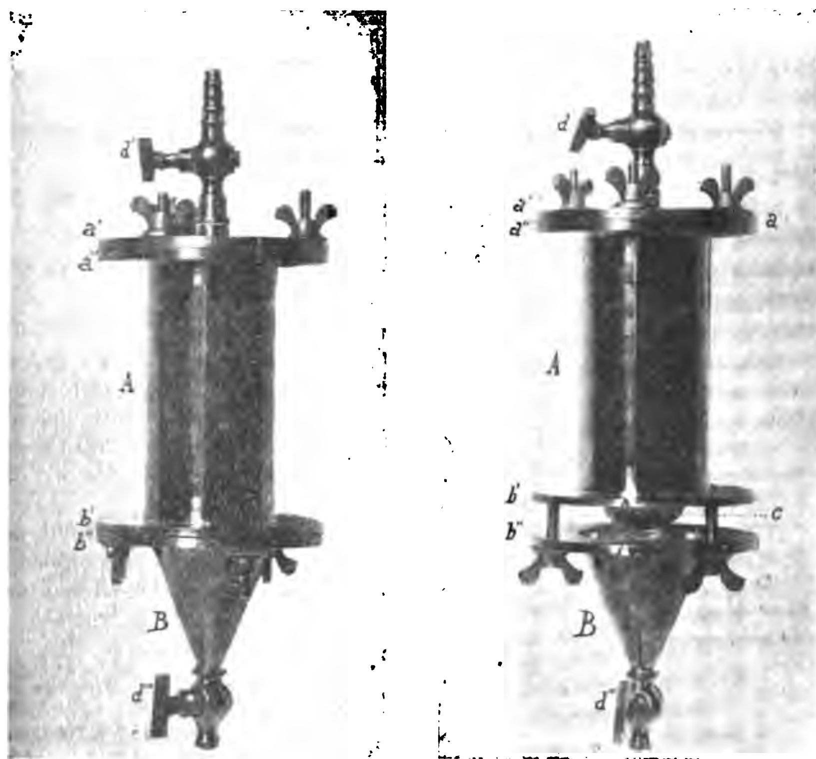
Frattanto, dopo averlo ben sperimentato, ho introdotto nell'apparecchio alcune modifiche che credo utili perchè evitano varii degli inconvenienti lamentati.

A tal uopo sostituisco la parte superiore dell'apparecchio con un pezzo metallico cilindrico (*A*) (fig. II) fornito di un coperchio ($a_{,}$) che si può chiudere ermeticamente per mezzo di viti e coll'intermezzo di un disco di gomma, coperchio che è provvisto di un tubetto con rubinetto ($d_{,}$).

Il fondo del cilindro non è piano, ma è rappresentato da una piastra ($b_{,}$) la quale è forata nel centro e al centro è adattato una cupola metallica a molti fori (*c*), che ha un diametro più piccolo del fondo del recipiente.

Questo fondo si adatta alla concavità di un imbuto (*B*) sempre metallico, il quale ha il bordo piano adattabile a quello della piastra che costituisce il fondo del recipiente precedente, e a cui si può fissare per mezzo di tre viti coll'intermezzo di un disco di gomma per ottenere una chiusura ermetica: questo imbuto è fornito di un rubinetto ($d_{,,}$).

Per far funzionare l'apparecchio si pone della lana di vetro nell'imbuto (*B*) e poi si adatta il cilindro (*A*) all'imbuto stesso, badando di mettere una discreta quantità di lana di vetro, acciocchè venga sufficientemente compressa contro le pareti del recipiente.



(Fig. II).

Quindi si svita il coperchio superiore del cilindro ($a_{/}$), si introduce la malta e l'alcool tenendo chiuso il rubinetto di cui è fornito il collo dell'imbuto (d'').

Adattato poi di nuovo il coperchio ($a_{/}$), tenendo chiuso il rubinetto (d') ad esso adattato, si sbatte bene per 10 minuti: quindi si lascia riposare e si adatta al tubetto ($d_{/}$) del coperchio l'apparecchio contenente cloruro di calcio, che viene fissato in modo da non poter sfuggire quando si comprime l'aria entro l'apparecchio.

In tutto il resto l'apparecchio è identico a quello del De Rossi e il suo modo di funzionare analogo.

Usando il dispositivo da me indicato, si è sempre sicuri di avere un filtro di lana di vetro sufficientemente compressa per cui l'alcool filtra sempre limpido, si evita l'inconveniente di veder saltare via il tappo di gomma e quindi l'apparecchio rimane sempre chiuso e si può fare lo sbattimento della malta nell'alcool con molta maggior sicurezza senza pericolo che l'apparecchio si rompa.

d) In quanto al metodo del De Rossi (1), con la sostituzione ai densimetri dell'alcool colorato con violetto di Genziana contenente tanta acqua quanta corrisponde a quella di una malta che ne contenga l'1.50 %, a me non è riuscito, così pratico, e sicuro come a tutta prima potrebbe credersi pur avendo cercato di mettermi nelle stesse condizioni del De Rossi.

Ho veduto anche qualche volta che usando malte aventi pochissima acqua, la diffusione si può avere.

e) Recentemente il Pagliani (2) ha pensato di ricorrere ad un metodo all'alcool in cui secondo l'A. fosse compendiata l'esattezza, la rapidità e la facilità di sperimentazione che sono necessarie in simili indagini perchè risultino pratiche.

Egli, consiglia di pestare in un mortaio contenente alcool 20-30, gr. di malta raccolta in un ditale di carta bibula pesato posto in pesa filtro pure pesato e poi di riversarlo nello stesso ditale attraverso il quale filtra l'alcool poi mettere il ditale in istufa a seccare e ripesare tutto insieme filtro pesafiltro e materiale. La differenza in peso fatti i dovuti conti starà a significare la quantitàdi acqua libera perduta dalla malta.

Il Momigliani (3) che ha sperimentato questo metodo in confronto al metodo del Glässgen avrebbe trovato che i dati ottenuti sarebbero alquanto superiori e questa differenza il Pagliani spiega dicendo che col suo me-

---

(1) *Di un apparecchio per la determinazione del grado di prosciugamento delle case nuove.* Questi Annali, Vol. X. 1900 p. 253.

(2) *Nuovo metodo per la determinazione dell'umidità delle pareti delle case.* Riv. Igiene e San. pubblica, Torino 1901.

(3) *Sul metodo Pagliani per la valutazione dell'umidità delle pareti.* Ingegnere Igienista, 1901, pag. 145.

todo non vi ha la perdita inevitabile di umidità per l'esposizione del materiale all'aria libera che vi deve essere inevitabilmente coll'altro.

Soltanto in questi ultimi tempi ho potuto fare qualche esperienza con questo procedimento in confronto col metodo Glässgen e mi sono convinto che esso fornisce realmente delle cifre superiori, perchè l'alcool non assorbe la sola acqua ma scioglie anche i cloruri che si trovano in certe malte. Aggiungerò anche che è bensì vero che l'alcool filtrato non dà un residuo apprezzabile ad occhio nudo, ma quando si pratichi l'esame microscopico, qual cosa alcune volta si può trovare. Ho poi trovato che per stabilire il momento in cui la malta posta nel ditale già trattata coll'alcool poteva ritenersi essicata perchè a volersi regolare da due pesate successive, il metodo diventa lungo e, almeno in mia mano, non la cede per semplicità a quello di Glässgen.

f) Oltre a questi procedimenti vi sono poi quelli cosidetti *per pesata della malta.*

Il procedimento consistente nello stabilire il grado di umidità delle mura dalla quantità di acqua della malta; più usato è quello del Glässgen (1). Esso infatti ha i seguenti vantaggi pratici:

1° è fondato su dati di fatto e quindi è a rigore un metodo scientifico;

2° è applicabile in ogni tempo e in ogni luogo indipendentemente dalle condizioni meteoriche esterne;

3° è facilmente controllabile, per cui il criterio di abitabilità non è lasciato al verdetto del perito municipale;

4° è, una volta impiantato l'apparecchio, checchè si dica in contrario, più spicciativo di tutti gli altri metodi, perchè opportunamente condotto, in un tempo relativamente breve, permette di dare il proprio giudizio.

Questo metodo è stato applicato su larga scala e ad esso vennero e vengono paragonati tutti gli altri procedimenti.

Tra di noi, il De Rossi (2) in questi ultimi tempi, lo ha applicato per giudicare dell'umidità delle malte delle case di Pisa ed è venuto a queste conclusioni:

il metodo di Glässgen è assai esatto e pratico e può utilmente venire adottato per stabilire il giudizio di abitabilità;

---

(1) Riportato da tutti gli autori. (Il lavoro orig. *U. d. Wassergehalt der Wände u. dessen quantitative Bestimmung*, trovasi nella Zeitschr. f. Biologie Bd. XL 1874).

(2) Loc. cit.

nella nostra regione la malta delle case vecchie, presa sia dall'intonaco che dagli interstizi tra i materiali, non contiene più dell' 1.50 % di acqua libera;

potrà quindi dirsi abitabile una casa nuova quando numerosi saggi di malta, prelevati dai muri esterni ed interni di diverse orientazioni e ai diversi piani, non dimostrano un contenuto di acqua evaporabile a 110°-110° maggiore di 1.5 %;

nelle mura con basso contenuto di acqua libera, l'acqua di idratazione rappresenta in generale, una frazione assai piccola e trascurabile dal punto di vista igienico.

La concessione del permesso di abitabilità delle case nuove deve dipendere dalla constatazione sperimentale col metodo di Glässgen (originale in una delle sue modificazioni) dell'avvenuto prosciugamento delle mura, non essendo possibile per la notevole variabilità del periodo necessario al prosciugamento, di limitarsi a stabilire un intervallo minimo di tempo, passato il quale le case nuove possano senz'altro essere abitate.

A Milano il Coggi (1), lo ha preferito agli altri metodi per stabilire la percentuale di acqua contenuta nella malta dei muri asciutti di varie case vecchie e costrutte da circa sei mesi concludendo che « si devono giudicare non sufficientemente prosciugati quei muri la cui malta prelevata in punti diversi delle pareti, sia dagli interstizi fra mattone e mattone, sia dall' intonaco, dia un contenuto in acqua superiore al 3 % ». Ha poi veduto che non sempre, dopo sei mesi dalla costruzione, il contenuto di acqua della malta è inferiore od uguale al limite massimo fissato del 3 %, ciò che dimostra che non è possibile stabilire in modo assoluto dopo quanti mesi una casa nuova possa essere abitata.

Anche in Germania, è questo il procedimento che si ritiene il migliore. Infatti, recentissimamente l'Abel (2) riepilogando, tutto quanto concerne le cause e l'azione dell'umidità delle mura ed i mezzi per toglierla, afferma che a nulla serve l'esame dell'aria dei vani da esaminare, mentre è ottimo il procedimento di stabilire il % di acqua nelle malte, convenendo coll'Emnerich, che esso possa essere fatto anche da persone non provette in ricerche chimiche. Secondo l'Abel non si può però stabilire con certezza la percentuale limite variando la cifra tollerabile dall'1 all'1 $^1/_2$ al 2 %, solo dice che per ben condurre la prova occorre prelevare la malta dalle mura interne e in diversi punti; e nel caso si tratti di case vecchie, richiedere, per l'abitabilità, che il % sia il minimo tollerabile.

Soltanto alcuni non sono favorevoli al metodo, perchè ritengono che con l'essiccamento a così alta temperatura, non solo si venga a togliere l'acqua di idratazione alle malte, ma anche l'acqua di cristallizzazione, specialmente quando si protrae l'essiccamento a 110°-120° per molte ore; nè a togliere questa obbiezione varrebbe essiccare a 100°, come fa l'Emnerich, poichè l'operazione si farebbe ancora a una temperatura troppo elevata. Però non pare che tale obbiezione abbia tutto quel valore che a prima vista parrebbe nel giudizio sullo stato sanitario degli ambienti: infatti, stando al

---

(1) *Ricerche relative all'umidità delle case di Milano.* Giorn. R. soc. ital. d'Igiene. Milano, Vol. XXIII, 1901, pag. 337.

(2) *Feuchte Wohnungen: etc.* Deutsche Vierteljahreschrift f. öff. Gesundheitspflege I. Heft. 1903.

lavoro del Ballner (1), il quale ha essiccate le malte a temperatura ordinaria, per 24-48 ore, in un essiccatore contenente pentossido di fosforo, e ha confrontato questo procedimento con quello del Lehmann e Nussbaum essiccando per 1 ora e $^1/_2$, i risultati che si ottengono sarebbero quasi identici. Le differenze infatti non si verificarono che nelle cifre decimali, mai negli interi, e generalmente con una lieve diminuzione del 0. 1, 0. 2, 0. 3, mai più del 0. 4 $^0/_0$. Infatti, le malte che col metodo di Ballner mostravano contenere il 4. 3, 8. 3, 0. 2, 3. 9, 1. 8, ecc., $^0/_0$ di acqua, col metodo di Lehmann e Nussbaum mostravano contenere rispettivamente il 4. 6, 8. 5, 0. 5, 4. 3, 2. 0, ecc., $^0/_0$. Certamente però essiccando per maggior tempo, la differenza deve aumentare, e come dirò in seguito, non si può essiccare soltanto 1 ora e $^1/_2$, perchè si rimane troppo distanti dal peso costante. Si dovrebbe quindi, per risolvere la questione, confrontare il metodo di Ballner con quello di Lehmann e Nussbaum, pesando malte contenenti le stesse quantità di acqua essiccate *sino a peso costante*.

Il Glässgen mette le malte in un'anitra di Liebig che riscalda direttamente alla fiamma o in un bagno di sabbia a 110°-115° per ore 1-1. 30 e durante il riscaldamento fa passare dell'aria proveniente da un gazometro costretta ad attraversare prima un tubo di Pettenkofer contenente acqua di barite per fissare l'acido carbonico e poi una boccia contenente $H_2 SO_4$ concentrato per trattenere l'acqua.

Si possono anche riscaldare contemporaneamente vari campioni di malta in diverse anitre di Liebig mettendole tutte insieme in comunicazione con la bottiglia contenente acido solforico. A tal uopo il tubo di efflusso del tubo di Pettenkofer (che si può sostituire con una torretta contenente potassa caustica) si foggia a doppio T e le quattro sue diramazioni si uniscono con quattro bottiglie di lavaggio contenenti acido solforico conc., ciascuna delle quali si mette in comunicazione con un'anitra: è questa la disposizione data dal De Rossi nell'usare il metodo del Glässgen.

Tale procedimento è però alquanto incomodo, vuoi perchè le anitre di Liebig sono molto fragili, poco bene maneggiabili, vuoi perchè bisogna avere molta cura di assorbire con carta bibula l'acqua che si evapora dalla malta, e quindi bisogna stare sempre attenti durante il funzionamento dell'apparecchio, vuoi infine perchè nello stesso tempo anche adottando la disposizione del De Rossi non si può essiccare che un piccolo numero di campioni.

A tutti questi inconvenienti ovvia la modificazione di Lehmann e Nussbaum (2).

Si pone la malta triturata, in una navicella di platino, di rame o di porcellana, che viene introdotta in un tubo di vetro, circondato da un manicotto metallico il quale si riscalda per mezzo di lampade Bunsen. Attraverso il tubo di vetro si fa passare dell'aria che precedentemente viene costretta ad attraversare delle torrette di cui alcune contenenti pomice imbevuta di acido solforico e altre imbevute di potassa.

---

(1) *Exper. Beiträge y. Methodik d. Mauerfeuchtigkeitsbestimmung.* Arch. f. Hygiene. Bd. 37, p. 310.

(2) *Studien u. Kalkmörtel u. Mauerfeuchtigkeit.* Arch. f. Hygiene Bd. IX, p. 223.

L'acqua di evaporazione della malta viene poi assorbita da acido solforico contenuto in un recipiente a bolla che è annesso al tubo di efflusso dell'apparecchio e attraverso cui l'aria è costretta a passare, portando seco il vapore acqueo, ricavato dalla malta.

Io mi sono servito molte volte di questa disposizione e ho trovato che nella pratica ha non pochi inconvenienti.

Anzitutto per far funzionare alternativamente i recipienti di vetro da cui si fa uscire l'aria sotto una certa pressione, si perde molto tempo e solo per questo non si può abbandonare a sè l'apparecchio, mentre funziona, per non interrompere la corrente dell'aria.

In secondo luogo il tubo nel quale si pongono le navicelle essendo di vetro e chiuso ai due estremi con due tappi forati, attraversati da due tubetti, facilmente nel porre i tappi a posto per ottenere una chiusura ermetica, si rompono i bordi del vetro, e dovendo fare molto uso dell'apparecchio accade sempre di farsi del male. Dippiù i tappi se di sughero finiscono col bruciarsi, se di gomma si rigonfiano e si attaccano alle pareti, quindi bisogna spesso cambiarli.

In terzo luogo, non è facile regolare la temperatura a 110°-120° e anche regolata, il termometro non segna quella interna, cioè delaria che passa nel tubo di vetro, ma quella dell'aria avvolgente, entro il manicotto metallico.

Io quindi ho cercato di perfezionare l'apparecchio togliendogli tutti gli inconvenienti enumerati.

A tal uopo ho fatto costruire un manicotto di ottone a doppia parete (fig. III e IV) del diametro esterno di cm. 7 e interno di cm. 4. 5, lungo cm. 65. Uno degli estremi (*a*) è chiuso da una placca metallica saldata a fuoco nel cui centro è fissato un tubo (*b*) il quale si mette in comunicazione con le torrette contenenti acido solforico e potassa (1). All'altro estremo è saldata a fuoco



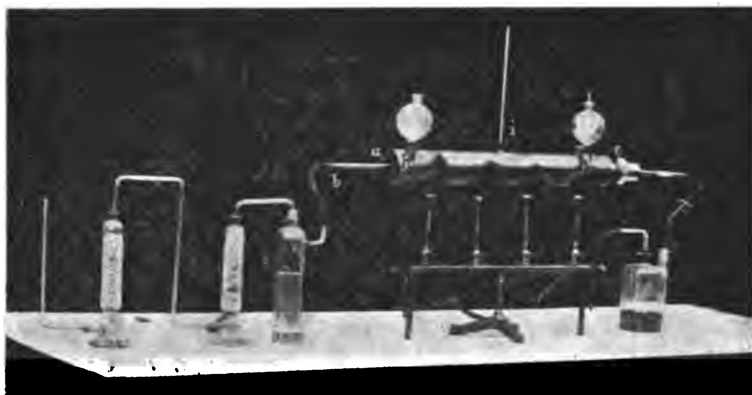
(Fig. III).

(1) Nella figura sono ridotte a tre per comodità fotografica.

la femmina di una chiavarda (fig. III c_2) del diametro dello stesso tubo interno.

A questa femmina si adatta il maschio (fig. III c_3) che è fornito di un tubo il quale si mette in comunicazione con una bottiglia ad acido solforico, la quale a sua volta è in comunicazione con una pompa aspirante a caduta di acqua.

Le malte poste in navicelle tarate e pesate si pongono in una doccia metallica (fig. III *e*) fornita di un manubrio (fig. III *f*), la quale si introduce dentro al lume del tubo. Questo poi si chiude adattando alla femmina il maschio della chiavarda ed ove occorra costringendoli a star ben uniti coll'avvitare l'anello (fig. IV *c*) della chiavarda.



(Fig. IV).

Il manicotto è poi fornito di vari fori di cui due (h e h_1) ne interessano solo la parete esterna e trovansi ai due estremi, e un altro (i) anche l'interno. Quest'ultimo si chiude con un tappo di gomma forato che si fa attraversare dal bulbo di un termometro, il quale viene quindi a segnare proprio la temperatura dell'aria dell'ambiente in cui si trovano le navicelle. Tutto l'apparecchio poggia poi sopra un apposito fornello a gas.

Quando lo si vuol far funzionare, si comincia ad aspirare l'aria: questa attraversa le torrette a potassa e ad acido solforico, ed entra nel tubo interno del manicotto. Nello stesso tempo si accende il fornello a gas e appena il termometro segna 110°, si sostituiscono le fiamme riducenti, con fiamme ossidanti, che si regolano opportunamente in modo che la temperatura non superi mai i 120°, ciò che riesce senza grande difficoltà (1).

Quest'apparecchio ha i seguenti vantaggi: è solidissimo e regge a qualunque temperatura; si può maneggiare facilmente senza pericolo che si rompa; non ha bisogno di tappi nè di sughero, nè di gomma; una volta impiantato e regolato, funziona da sè senza bi-

(1) Ho provato a versare fra le due pareti del manicotto delle soluzioni di sali che bollano a determinate temperature (115° C. p. es.) o glicerina, od olio; ma è una pratica perfettamente inutile e che più o meno degenera in inconvenienti pratici ove si volessero usare nei due fori h e h_1 si introducano i colli di imbuti che è preferibile abbiano la forma sferica.

sogno di essere sorvegliato; si possono essiccare molti campioni insieme; si è sicuri della temperatura a cui si essiccano perchè il bulbo del termometro entra dentro al tubo interno, ecc.

Per ottenere con esso buoni risultati è però necessario, tenere presenti i seguenti precetti fondamentali:

Le navicelle debbono essere prima pesate vuote e secche (si tengano in un essiccatoio ad H_2 SO_4 o nell'apparecchio funzionante senza riscaldarlo); la malta deve essere triturata in un mortaio non umido (che si tiene quindi in un essiccatore); la pesata delle malte nelle navicelle va fatta con l'esattezza del milligrammo preferibilmente in un pesafiltro cilindrico chiuso ai due lati con due coperchi smerigliati; l'aspirazione nell'apparecchio va regolata in maniera da non produrre una forte corrente d'aria che sollevi particelle di malta; il riscaldamento, quando tutte le navicelle siano a posto, va iniziato dopo che si è aspirato per qualche minuto.

Quel che più interessa poi è che il riscaldamento a 110°, sia protratto per un tempo determinato, perchè a me pare che appunto da esso dipenda il risultato definitivo e il diverso valore limite, assegnato dagli osservatori alla quantità di acqua °/₀ tollerabile nella malta dei muri degli ambienti abitabili, e che la piccola quantità di acqua °/₀ trovata nelle case asciutte dai tedeschi ed indicata come tollerabile per l'abitabilità (1 °/₀) dipenda dall'essiccare le malte nell'apparecchio del Lehmann e Nussbaum per un tempo troppo limitato (un'ora).

È noto infatti che i vari sperimentatori non si sono ancora accordati circa il per cento di acqua limite che devesi stabilire per dichiarare abitabili gli ambienti. Questo limite in fatti che per Glässgen è dell'1 °/₀, sale per Lehmann e Nussbaum al 2 °/₀ e per altri discende al 0.50, 0.60 o sale ancora al 3 °/₀.

Da uno studio comparativo da me fatto pesando malte contenenti la stessa quantità di acqua, essiccate a 110° per vario tempo ho ottenuto i seguenti risultati:

Quantità per cento di acqua nella malta essiccata a 110° (1)

sino a peso costante (essiccata 4 volte per 3 ore a 110°)	per 1 ora	per 2 ore	per 3 ore	per 4 ore
2.33	1.11	2.00	2.28	2.30
2.57	1.21	2.01	2.31	2.51
2.69	1.58	2.12	2.49	2.66
2.94	1.72	2.50	2.32	2.90

dove si vede che, bastano 4 ore per avvicinarsi alla cifra che si ottiene quando il peso della malta diviene costante; per il quale occorre realmente ripetere il prosciugamento per 2-3 ore per non meno di quattro volte come ha veduto il De Rossi.

Inoltre bisogna badare bene che la pesata della malta si faccia dopo che l'apparecchio sia bene raffreddato, altrimenti si ottengono degli errori costanti almeno nelle prime cifre decimali. Non è però altrettanto necessario di pesare le navicelle in appositi pesafiltri, per evitare il contatto coll'aria esterna e quindi un possibile assorbimento del vapore acqueo dell'aria stessa, perchè l'errore che si commette non interessa ordinariamente che la seconda cifra decimale, e solo qualche volta la prima; mai però gli interi. Ciò risulta dagli esperimenti che riporto nella seguente tabella:

Acqua °/₀ nella stessa malta essiccata a 110° per 4 ore pesata		
mettendo la navicella in pesa filtro lavato e seccato	mettendo la navicella in pesa filtro non essiccato in un essiccatore	mettendo direttamente la navicella sul piattino della bilancia
18.7165	18.7065	18.7076
31.2190	31.2003	31.2178
4.0772	4.0671	4.0707
12.4743	12.4666	12.4677
37.9226	37.9170	37.7214
33.7128	33.7111	33.7089

Infine, è assolutamente necessario che l'essiccamento si faccia in corrente di aria secca e priva di acido carbonico. Qualora una di queste condizioni venga a cambiare i valori che si ottengono variano.

(1) Queste pesate e le altre di cui si parla nel presente lavoro, sono state fatte con la massima esattezza: e non poche di esse con controlli che ha fatto il chimico dott. S. Condelli, che ringrazio per la sua cortesia.

Infatti, dalle ricerche fatte sui campioni di malta provenienti dallo stesso sito, essiccati nel vuoto a 100° come fa Emmerich (1), o anche semplicemente in una stufa a essiccare come pur troppo si pratica in alcuni laboratori, ho trovato i dati esposti nella seguente tabella:

Percentuale dell'acqua nella malta dopo essiccamento per 4 ore		
nella stufa ad essiccamento	nel vuoto e a 100°	in corrente d'aria secca e priva di acido carbonico
2.29	3.62	3.90
7.86	8.63	8.75
6.18	7.90	8.10
4.88	6.20	6.40
2.20	3.63	4.00
3.10	3.99	4.00
3.35	5.14	5.31
4.30	6.31	6.40
3.10	6.06	6.09
3.12	4.63	4.71
3.95	6.29	6.33

dove si vede che coll'essiccamento in corrente di aria secca e priva di acido carbonico, si ottengono, fatti i debiti calcoli, le cifre più alte.

Ricerche speciali sull'abitabilità delle case di Roma.

Dopo aver controllati tutti questi procedimenti, non credo inutile riferire i dati cui essi mi hanno condotto, quando ho cercato di portarli nella pratica per giudicare dell'abitabilità delle case di Roma.

Ho praticato all'uopo numerose ricerche: però, non riferisco che quelle che ho potuto fare in comparazione coll'esame psicrometrico.

I risultati ottenuti possono leggersi nelle seguenti tabelle:

(1) *U. eine neue Methode z. Bestimmung der Wandfeuchtigkeit.* Arch. f. Hygiene Bd. XIV, pag. 243.

Ammezzato e sotterra. — Nell'ala sinistra di un caseggiato a due piani, sito in via dello Statuto, costrutto da più di 8 anni e adibito ad uso abitazione. — Esposizione degli ambienti esaminati a settentrione e a mezzogiorno.

Data dell' esame	Esposizione e stato degli ambienti	Esame psicrometrico: U. R. esterna nelle 48 ore, massimo	Esame psicrometrico: U. R. esterna nelle 48 ore, minimo	Esame psicrometrico: U.R. interna	Ubicazione delle mura da cui venne prelevata la malta	Risultato col metodo De Rossi	Risultato col metodo Lehmann e Nussbaum
..	Camera esposta a sud, prospiciente nella strada, con una finestra e due porte.	63	59	61	Sud	Costantemente superiore all' 1.50 per cento	3.62
					Est		3.61
..	Idem (camera vicina, 3 porte).	63	59	61	Ovest		3.61
..	Idem (camera vicina, 2 porte).	63	59	63	Nord		3.62
..	Corridoio con 2 finestre e altra apertura prospiciente a nord in un piccolo cortile.	63	59	63	Sud		3.63
					Nord		3.99
..	Corridoio sotterra, idem.	63	59	69	Sud		5.14
..	Camera sotterra, prospiciente a sud, con piccola finestra a livello della strada, 2 porte.	63	59	67	Ovest		4.63
					Est		6.06
..	Idem (camera vicina), 3 porte	63	59	68	Nord		6.29
					Sud (sotto la strada)		14.90
..	Camera esposta ad est, prospiciente nel cortile, con una porta prospiciente nel corridoio dell'ammezzato.	63	59	69	Ovest		6.20
					Nord		8.63
					Sud		7.90
					Est		8.31

Mezzanino nell'ala sinistra di un fabbricato a piano, sito in via Principe Amedeo, n. 86 (interno 2), costrutto da più di 10 anni e adibito ad uso di abitazione. — Esposizione degli ambienti esaminati a settentrione e a mezzogiorno.

Data dell'esame	Esposizione e stato degli ambienti	Esame psicrometrico: U. R. esterna nelle 48 ore, massimo	Esame psicrometrico: U. R. esterna nelle 48 ore, minimo	Esame psicrometrico: U. R. interna	Ubicazione delle mura da cui venne prelevata la malta	Risultato col metodo De Rossi	Risultato col metodo Lehmann e Nussbaum
Maggio 1901 (4-5-6)	Camera esposta a sud-ovest prospiciente in un grande cortile, con una sola finestra e una sola porta.	65	35	63	Sud-ovest	più di 1. 50 %	3. 28
					Ovest (nessuna apert.)	id.	3. 53
					Nord-est	id.	3. 21
Id.	Camera esposta a nord-est, prospiciente sulla strada, con una sola finestra e una sola porta.	65	26	60	Sud-ovest	id.	2. 99
					Nord-est	d.	2. 71
					Sud-est	id.	2. 78
Id.	Idem	67	69	69	..	id.	2. 86
		71	73	68	..	id.	2. 59
		73	81	69	..	id.	2 71

Palazzetto dell'Istituto d'Igiene (via Agostino Depretis, angolo via Palermo), a tre piani, esposto a nord, est e sud-est, adibito ad uso abitazione da tempo remoto, riattivato ad uso di laboratorio sino dal 1886.

Data dell'esame		Esposizione e stato degli ambienti esaminati	Esame psicrometrico: U. R. esterna massimo	Esame psicrometrico: U. R. esterna minimo	Esame psicrometrico: U. R. interna	Ubicazione delle mura da cui venne prelevata la malta	Risultato col metodo De Rossi	Risultato col metodo Lehmann e Nussbaum
Settembre e ottobre 1902	Piano terreno	Camera a pianterreno, sopra le cantine, esposta a nord-est e sud-est, con due finestre e una porta.	..	..	55	Nord-est	Costantemente superiore all'1.50 per cento	4.11
Id.	Piano terreno	Camera vicina, esposta a nord-est, con due porte.	..	..	62	Nord-est		3.99
Id.	Piano terreno	Camera esposta ad sud-est, con due finestre, una aperta in un giardino e una in un piccolo cortile, e una sola porta.	..	..	63	Nord-est		5.63
			..	..		Sud-ovest		5.65
Id.		Aula (vecchia chiesa)	..	..	60	Sud-est		3.00
			..	..		Sud-ovest		3.10
Agosto 1902	Mezzanino	Camera, esposta a nord-est, con una sola finestra e una sola porta.	..	..	55	Nord-ovest		3.11
Id.	1° piano	Camera esposta a nord-est, con una finestra e una porta.	..	..	61	Nord-est		3.69
			..	..		Sud-ovest		3.53
Id.	2° piano	Corridoio esposto a sud-ovest, con tre finestre e quattro porte,.	..	..	63	Sud-ovest		2.12
			..	..		Nord-est		2.15
Id.	id.	Camera esposta a nord-est, con una finestra e una porta.	..	..	59	Sud-est		2.10
Id.	Cantina	Camera, esposta a nord-est, con due finestre a livello del giardino e una sola porta.	..	..	89	Nord-est		25.1
			..	..				26.1
			..	..				26.3

Palazzo dell' Esedra, a 5 piani, in via di costruzione, esposto ad est, nord-est ed ovest, sito in Piazza dell' Esedra, a sinistra, non ancora adibito ad uso di abitazione, costruito e coperto da un anno, intonacato da 3 mesi al momento dell'osservazione.

Esposizione e stato degli ambienti	Data dell'esame psicrometrico	Esame psicrometrico: U. R. esterna massimo	Esame psicrometrico: U. R. esterna minimo	Esame psicrometrico: U. R. interna	Data prelevazione dei campioni di malta	Ubicazione delle mura	Risultato col metodo De Rossi	Risultato col metodo Lehmann e Russbaum
	..	..	..	68	ottobre 1902	Sud-est	Costantemente superiore all'1.50 per cento	6.78
Camere esposte a est (facciata semicircolare), 1° piano.	..	..	..	..	id.	Sud		5.99
	..	..	..	..	id.	Sud (fondo)		6.98
	..	..	.	62	id.	Ovest		3.06
Camere esposte ad ovest	..	..	..	69	id.	...		3.00
	..	..	..	..	id.	Est		3.03
Camere esposte ad est, 2° piano . . .	..	..	..	..	id.	Idem		3.05
	..	..	..	64	id.	Sud		3.51
	..	..	..	66	id.	Ovest		2.98
Camere esposte a nord-est (ancora incompleto il pavimento e l'intonacatura).	..	..	..	..	id.	...		2.75
	..	..	..	63	id.	Nord-est		8.47
	..	..	..	..	id.	Idem		7.51
Camere esposte ad ovest, mezzanino .	..	..	..	..	id.	Ovest		5.67
Camere esposte ad est	..	..	..	..	id.	Est		6.20
	..	..	..	..	id.	Sud		5.49

Primo piano del nuovo Convento dei Padri Domenicani sito al Viale del Re, con esposizione ad Sud-Est e a Est, non ancora adibito ad uso di abitazione - costruito da sei mesi.

Data dell'esame	Esposizione, stato degli ambienti esaminati	Esame psicrometrico U. R. esterna mass.	Esame psicrometrico U. R. esterna min.	U. R. interna	Ubicazione delle mura da cui vennero prelevate le malte	Risultato col metodo De Rossi	Risultato col metodo Lehmann e Nussbaum
Ottobre 1902	Camera esposta a nord ovest con una porta e una finestra	..	..	58	Nord-ovest	..	13. 02
					Sud-ovest	..	10. 10
	Camera esposta a nord-ovest.	..	..	57	Ovest	..	11. 12
	Camera esposta a sud-ovest	..	..	56	Sud-ovest	..	4. 05
					Nord-ovest	..	4. 19

Dai dati esposti in queste tabelle risulta, che nelle case vecchie, da tempo adibite ad abitazioni, il per cento di acqua nelle mura negli ambienti meglio esposti, si aggira intorno al 3 % (dal 2. 50 al 3. 50) cifra che è alquanto più elevata nelle mura dei piani che più sono vicini al suolo, e meno in quelli che trovansi più elevati dallo stesso, potendosi pei primi raggiungere una cifra vicina al 4 % e per i secondi vicina al 2 %.

Se ne deduce ancora, che la data delle costruzioni non basta per giudicare dell'abitabilità degli ambienti nuovi: infatti nel palazzo dell'Esedra le mura delle camere già complete da un anno presentavano un per cento di acqua molto superiore al 3 %, salvo le mura che erano esposte ad ovest, le quali presentavano le malte contenenti un per cento d'acqua che più si avvicinava a questo limite (1).

(1) Nell'ala sinistra prospiciente in piazza delle Terme nell'appartamento già adibito ad uso di abitazione al primo piano (che era ancora incompleto quando io praticai le ricerche nel palazzo in discorso) ho trovato il 1° febbraio 1903 ancora le seguenti quantità d'acqua per cento nelle malte delle mura:

Muro esposto a nord-est. . . . . 11 %
Id. a sud-est . . . . 8 3 %
Id. a sud-ovest . . . . 7. 6 %

Va però notato che queste alte quantità di acqua trovate, stanno in rapporto col fatto che ripetute volte erano state accese negli ambienti le stufe (allo scopo di renderli asciutti!) per cui l'acqua rattenuta nelle mura veniva richiamata agli strati più interni delle pareti. Difatti la camera le cui mura presentarono maggior quantità di acqua, fu precisamente quella dove si trovava una di tali stufe, camera che per essere situata fra due meno umide, doveva essere umida tutt'al più in egual grado.

Se ne ricava infino che a volere giudicare dell'abitabilità di certe case dal grado dell'umidità relativa, si rischia di dichiararle abitabili quando il per cento di acqua nelle mura supera il 3 %, come può accadere il contrario quando si chiudano in un momento in cui l'umidità relativa esterna sia bassa ma poi subito si rilevi e rimanga durevolmente elevata.

Non intendo però con questo di avere risolta la questione circa il per cento limite da stabilirsi per l'abitabilità delle case nuove a Roma. Lascio la questione agli egregi colleghi del laboratorio micrografico di Roma, che so, si interessano con zelo dell'argomento.

Conclusioni.

Dal fin qui esposto circa i procedimenti empirici, fisici e chimici indicati per giudicare dell'abitabilità delle case dal grado di umidità degli ambienti possono trarsi le seguenti conclusioni:

1° Ben poco o nessun valore hanno i metodi empirici, compreso quello di Esmarch-Abba, perchè soggetti a cause di errore indipendenti dalla umidità delle mura;

2° Tra i varî metodi fisici, anche quello psicrometrico non ha che un valore molto relativo perchè così come si usa per trovare un % limite dell'umidità dell'aria, non si può praticare che in periodi di asciuttezza durevoli dell'aria esterna: esso è influenzato dall'umidità relativa dell'aria esterna anche essendo le mura asciutte, e non è influenzato dall'umidità delle mura (per quanto a me risulta, nelle condizioni in cui mi sono posto) se non quando queste contengono più del 4 % d'acqua; di più non si è finora tenuto conto nel praticarlo della temperatura e della umidità assoluta dell'aria degli ambienti;

3° Pochissimo attendibili sono pure i metodi coi quali si vuole giudicare dell'abitabilità degli ambienti dall'umidità dell'aria aspirata attraverso le mura: fra di essi ad ogni modo si potrebbe tentare di applicare il procedimento, da me indicato, del gorgogliamento di 20 litri di aria in alcool di una data densità colorato col cloruro di cobalto;

4° Il metodo De Rossi, coi densimetri, modificando la parte superiore dell'apparecchio, nel modo da me proposto, per renderlo più facilmente maneggevole, potrebbe servire a giudicare dell'umidità limite della malta; ma, vuoi per la difficile fattura dei densimetri, vuoi per l'esigenze tecniche che richiede non può nella pratica applicarsi da tutti con sicurezza;

5° Tra i metodi, per pesata della malta, quello di Glässgen, con la modificazione di Lehmann-Nussbaum, e con l'uso dell' apparecchio metallico solido e sicuro da me indicato, è il solo che offre le maggiori garanzie di esattezza: con questo procedimento per conoscere il per cento di acqua nelle malte, basta l'essiccamento a 110°, per la durata di 4 ore e non meno, in aria secca e priva di acido carbonico: altrimenti si ottengono dei valori troppo piccoli, come col metodo Glässgen originale, e si finisce collo stabilire un per cento limite di acqua nella malta inferiore al reale, come fanno alcuni tedeschi;

5° In Roma, nel voler giudicare dell'abitabilità delle case, non si può dar peso al metodo psicrometrico nel modo ordinariamente usato e quindi neanche ai limiti dei gradi di umidità relativa sinora stabiliti: col metodo Lehmann-Nussbaum, adoperando il mio apparecchio, parrebbe sinora che il limite per cento di acqua tollerabile nelle malte non sia inferiore al 3 % nei piani bassi, e inferiore al 3 % ma non al 2 % negli ultimi piani.

Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università di Roma

Nuovo metodo per la colorazione delle ciglia dei batteri

per il dott. **ALBERTO CERRITO.**

(Con le Tavole IV e V).

L'esistenza delle ciglia in alcuni microrganismi fu dimostrata per la prima volta dal Koch nel 1877.

Egli ebbe ad osservarle in alcune specie di spirilli e di batteri, in semplici preparati a secco e senza materiale d'inclusione, servendosi di un'adatta illuminazione. Non riuscì però a colorarle coi colori di anilina e si servì di una soluzione acquosa satura di estratto di legno campeggio. In tal modo ha potuto metterle in evidenza ma in pochissime specie di batteri mobili.

La scoperta delle ciglia nei batteri segnava intanto un passo importante nello studio della morfologia di essi, sia per la classificazione dei batteri sia per la diagnosi differenziale di alcuni microrganismi patogeni da altri non patogeni, fino allora determinabile soltanto per mezzo di speciali e lunghi procedimenti di tecnica batteriologica. Ma la ricerca fatta col metodo del Koch, efficace soltanto per alcune specie di batteri mobili, non poteva riuscire utile per tutti.

Le ciglia, per il loro indice di rifrazione identico a quello dei mezzi in cui si osservano i batteri, tranne qualche rarissima eccezione, non sono visibili nè nei preparati a fresco nè in quelli a goccia pendente. Dippiù esse non hanno alcuna affinità per le sostanze coloranti usate in batteriologia, per ciò riesce difficile di metterle in evidenza. Da ciò lo studio dei batteriologi per trovare un metodo di colorazione universale delle ciglia batteriche.

Fu il Löffler il primo che applicando una pratica seguìta nell'arte tintoria per la fissazione dei colori sulle fibre tessili riuscì a mettere in evidenza le ciglia coi colori di anilina. Egli ha fatto

agire sul materiale prima un mordente a base di tannino e ferro e poi il colorante.

In tal modo ha ottenuto la colorazione per tutte le ciglia dei batteri mobili ed il suo metodo fino ad oggi è il più largamente usato in batteriologia. Alcuni autori in seguito hanno modificato il metodo di Löffler allo scopo di semplificarlo, altri ancora tentarono procedimenti affatto nuovi.

***

In un lungo e paziente studio di controllo da me fatto in questo Istituto ho sperimentato tutti i metodi di colorazione delle ciglia prima raccomandati.

Sarebbe fuor di luogo far qui la descrizione di tutti i metodi che ho sperimentato a cominciare da quello Löffler. Dirò soltanto che in tale studio ho seguito piuttosto il criterio di una certa affinità tra alcuni metodi anzichè l'ordine cronologico. Ho pertanto diviso i metodi in tre gruppi: quello del Löffler, di Nicolle e Morax, di Bunge, di Remy e Sugg; quello del Van Ermenghem, dell' Hinterberger, e quelli di Bowhill, Trenkmann, Sclavo, De Rossi e Strauss.

In questa paziente revisione ho seguito scrupolosamente tutte le norme di tecnica.

Col metodo del Löffler ho potuto ottenere buone colorazioni di ciglia, ma con estrema difficoltà. Prima di tutto è da notare che le ciglia si colorano in una percentuale troppo esigua di preparati. La colorazione non è soddisfacente perchè l'abbondante precipitato che si produce impedisce di distinguere nettamente le ciglia. Anzi a volte esso si dispone in filamenti che si confondono con le ciglia, altre volte questi soli filamenti esistono mentre le ciglia non hanno assunta colorazione.

L'aggiunta poi di acido o alcali a seconda che si voglia agire su di un batterio alcalinizzante oppure acidificante l'ho riscontrata perfettamente inutile, anzi posso affermare che se sono riuscito in qualche preparato è stato quando non ho seguito questa norma.

Il metodo del Nicolle e Morax (togliendo l'aggiunta della soluzione acida o alcalina e facendo agire più volte l' inchiostro), non porta, secondo la mia esperienza, i miglioramenti desiderati perchè con le molteplici mordenzature il precipitato si produce più abbondante. Qualche volta in mezzo a tale precipitato mi è riuscito di scorgere le ciglia ma in modo molto confuso. Epperò io non vedo l'utilità di preferire questo metodo a quello del Löffler. Col metodo del Bunge, il quale ha reso più complicata e lunga la tecnica, non

ho potuto ottenere risultati positivi. Nè migliore risultato ho avuto dal metodo di Remy e Sugg, poichè se è vero che precipitati non si formano, è pur vero che la proprietà che debbono assumere le ciglia di fissare il colore per virtù del mordente, non si ottiene, ed io ho avuto sempre preparati pulitissimi, ma senza colorazione delle ciglia.

Il metodo di Van Ermenghem mi ha dato qualche risultato positivo ma a dire il vero non è da preferirsi a quello del Löffer sia perchè molto lunga è la tecnica e piena di difficoltà, sia perchè i precipitati sono finissimi ed abbondanti in modo che spesso si ottiene uno strato uniforme di essi, da cui spiccano soltanto i corpi batterici, restando le ciglia completamente coverte. Nè migliori risultati ho ottenuti col metodo Hinterberger il quale ha modificato il precedente prescrivendo una serie lunga di minuziose manipolazioni. A me non è riuscito mai un preparato. Lo stesso risultato ho ottenuto coi metodi di Bowhill, Trenkmann, Sclavo.

Anche i tentativi di colorazione delle ciglia a goccia pendente secondo il metodo Strauss sono sempre rimasti infruttuosi.

Finalmente il metodo De Rossi così come è descritto dall'autore nella sua prima memoria, non mi ha dato del pari buoni risultati; difficilmente sono riuscito a colorare qualche ciglio. In quanto al suo secondo procedimento è assai difficile colpire il momento giusto in cui avviene la formazione del precipitato nè scarso nè soverchio, e quindi, se esso in mano all'autore oramai provetto, riesce bene, in altre mani incontra le difficoltà che su per giù si incontrano adoperando il primo procedimento.

Non intendo però dare a queste mie asserzioni un valore assoluto poichè io ho potuto non interpretare fedelmente le norme rispettivamente date dagli autori; senza alcun dubbio ciascun metodo ha il suo valore nelle mani dell'inventore o di persone abilissime in tecnica batteriologica che si esercitino in tali ricerche.

***

Attesa quindi la incertezza dei risultati ottenuti, le difficoltà tecniche, la poca nettezza dei preparati riusciti e l'impiego di molto tempo per le manipolazioni dei metodi che mi hanno dato qualche risultato, mi sono determinato a fare delle ricerche per mio conto, indirizzate allo scopo di vedere se fosse possibile trovare un metodo di colorazione delle ciglia scevro di tutti gli inconvenienti fin qui lamentati.

Nei vari tentativi fatti ho sperimentato una quantità straordi-

naria di sostanze, non esclusi tutti i preparati d'argento e sali metallici, che a parer mio avrebbero potuto intaccare la sostanza di cui sono composte le ciglia e quindi favorire in esse la penetrazione del colore.

Essendomi tutti falliti sempre, convinto che il metodo Löffler, fondato sulla pratica tintoria, è quello che risponde meglio, ho voluto esperimentare tutte le sostanze note nell'arte tintoria. Nell'allume ferrico ho riscontrato ottime qualità mordenzanti, quando trovasi unito all'acido tannico ed alla fucsina. Epperò con accurato lavoro di dosaggio sono riuscito a trovare il maximum di efficacia nella formola che darò in seguito.

Non trovo fuori di luogo fare notare che se il concetto del Löffler, da me seguito, della teoria tintoria, vale a dire della formazione sulle ciglia di una lacca colorabile mi ha condotto alla scoperta di un liquido davvero efficace, io, però credo che una nuova sostanza si formi nel miscuglio, la quale attacca le ciglia con un meccanismo ancora molto oscuro, come oscura è la nozione sulla costituzione delle ciglia. Questa sostanza si produce in condizioni speciali del miscuglio stesso ed agisce anche in condizioni speciali più o meno determinabili.

All'azione del mordente faccio seguire il colorante che può essere uno qualsiasi, ma è preferibile sempre lo Ziehl secondo la formola originale.

***

Preparazione del mordente. — Il liquido mordente è costituito così:

Soluzione acquosa di tannino al 25 % cmc. 20.

Soluzione acquosa di allume ferrico al 50 % cmc. 10.

Soluzione alcoolica satura di fucsina, cmc. 1.

Prima di tutto bisogna avvertire di usare tannino purissimo, quello che in commercio si vende col nome di tannino all'etere; l'allume ferrico deve essere anche purissimo e deve presentarsi in grossi cristalli di colore lilla. La fucsina la quale si presta di più è la fucsina basica; la soluzione satura deve essere fatta in alcool non tanto forte poichè ho osservato che l'alcool assoluto o quasi ne scioglie pochissima: l'alcool a 90° è quello che serve meglio.

Le soluzioni di tannino e di allume ferrico vanno preparate in bottiglie a chiusura ermetica in modo che nel bagno maria, dove deve avvenire la soluzione, non si disperda l'etere del tannino e l'ammoniaca dell'allume ferrico.

Raffreddata la soluzione, in una terza bottiglia a ermetica chiusura si versano cmc. 20 di soluzione tannica e cmc. 10 di soluzione ferrica, con che si ottiene un liquido nero tendente al bleu.

A questo liquido si aggiunge un cmc. di soluzione alcoolica satura di fucsina e allora il colorito da bleu diventa viola carico. Si tappa bene e si mette questo miscuglio in un bagno maria la cui acqua si porta alla ebollizione, avvertendo di agitare ogni tanto. A poco a poco il colore impallidisce fino a divenire pavonazzo tendente al viola. In questo momento si toglie dal bagno, si agita un pochino e si conserva. L'esperienza mi ha dimostrato che soltanto in presenza dell'etere e dell'ammoniaca (nella dose in cui si trovano nei rispettivi tannino ed allume ferrico ed a temperatura elevata) si ottiene il corpo che dispone le ciglia a colorirsi.

Chè se noi vogliamo usare il miscuglio senza avere agito su di esso con forte calore e senza averlo agitato otteniamo un precipitato su tutta la superficie del coprioggetto, a guisa di panno grigio bluastro. Ciò qualunque sia la pulizia del vetrino ed agendo a freddo sia pure per un secondo, anche se dopo si lava sotto un forte getto di acqua. Le ciglia in tal modo non si colorano affatto; del resto non sarebbero visibili anche se colorate perchè coperte completamente dalla patina.

Il liquido così fatto non ha bisogno di essere filtrato e può adoperarsi appena raffreddato sebbene sia meglio servirsene un giorno dopo. Esso si conserva a lungo senza perdere le sue proprietà.

Soltanto ho osservato che di inverno ha bisogno di esser tenuto in un termostato e bisogna adoperarlo in una stanza riscaldata almeno a 22° Si può però ovviare a questo inconveniente col prolungare l'azione del mordente per 10 minuti, a freddo: però il precipitato, che ha il tempo di depositarsi sul vetrino non permette di ottenere preparati molto puliti.

Preparazione del liquido colorante. — Il liquido colorante preferibile è il liquido di Ziehl originale così fatto:

Acqua distillata	gm.	20
Acido fenico cristallizzato . . .	»	1
Alcool	»	2
Fucsina	cgr.	5

***

Pulizia del vetrino. — Condizione indispensabile per la buona riuscita dei preparati è l'estrema pulizia dei copri-oggetti, perchè il mordente si fissa su qualsiasi impurità che trovasi sul vetrino e rende il prepa-

rato poco nitido. Il modo migliore per pulirli è il seguente: si fanno bollire in una soluzione di potassa al 10 per cento per circa dieci minuti, dopo si lavano sotto un getto di acqua comune, e poichè presentansi offuscati pel deposito su di essi della potassa, si passano in una soluzione di un acido minerale al 10 per cento.

Quivi si lasciano per un quarto d'ora agitandoli con bacchettina di vetro pulitissima. Dopo ciò si lavano accuratamente sotto un getto d'acqua comune e si conservano in acqua distillata. A misura che debbonsi adoperare si prelevano con apposita pinzetta e si stropicciano con una pezzuola *grossolana* di lino pulitissima. La pezzuola deve essere grossolana perchè quelle di tela finissima, durante lo stropicciamento lasciano passare dalle maglie sul vetrino il grasso delle dita. Allestiti così i vetrini si depone su ciascuno, con ansa di platino, una goccia di acqua distillata che dovrà ricevere il materiale d'esame e si mettono sotto una campana per sottrarli al pulviscolo. L'acqua per l'estrema pulizia del vetrino si espanderà rapidamente su di esso in forma perfettamente circolare. Se il vetrino non è pulito, allora la gocciolina d'acqua resterà quasi sferica ed il vetrino sarà meglio non adoperarlo per farne colorazioni di ciglia.

Allestimento del preparato. — Il materiale prelevato dalle culture in brodo o da quelle in gelatina, come è noto, dà dei preparati poco netti poichè vengono a colorirsi una gran quantità di sostanze estranee ai bacteri.

Il materiale migliore è dato dalle culture per strisciamento in agar preparato di recente, di colore ambra, trasparentissimo, privo di glicerina e che contenga non più del 5 per mille di cloruro di sodio. Se l'agar non è preparato in questo modo, i batteri ciliati si presenteranno in ammassi di varia grandezza da cui si vedono partire filamenti. Per ottenere preparati molto netti è necessario servirsi di culture giovani (da 12 ore a 3 giorni), perchè nelle culture vecchie i batteri parte hanno perdute le ciglia e parte sono già disfatti ed i loro detriti si colorano anche essi alterando il preparato. Se a questo si aggiunge la quantità straordinaria di ciglia che si staccano durante la manipolazione, pochi sono i germi su cui può cadere la osservazione.

Con l'ansa di platino si preleva un po' di materiale dalla cultura, avvertendo di asportarlo strisciando assai delicatamente sulla patina per non portar via anche dell'agar che comprometterebbe la nettezza del preparato. Si porta indi in vetrino di orologio contenente 2 cmc. di acqua distillata senza agitare l'ansa per far distaccare il materiale ma aspettando che se ne vada in fondo da sè.

Tutt'al più si può portare delicatamente fuori dell'acqua ed immergere ripetute volte ed in uno di questi movimenti il materiale colerà in fondo dove si lascia un poco per farlo sgretolare. La distribuzione in tutta l'acqua sarà favorita da movimenti di va e vieni impressi al vetrino.

Allorchè il liquido acquisterà l'aspetto di una leggera emulsione appena appena lattiginosa, con un'ansa piccolissima si porterà una gocciolina di questa emulsione su ciascun vetrino di quelli già approntiti sotto la campana e su cui avvi una goccia d'acqua distillata. Si portano indi in un essiccatore ad acido solforico dove dopo dieci minuti od un quarto d'ora il materiale è essiccato.

Dopo ciò il vetrino si passa per due o tre volte alla fiamma per fissare il materiale. Osservandolo per trasparenza, si vedrà un cerchio bianco-opalino il quale rappresenta la raccolta dei germi al margine della goccia d'acqua.

Dal cerchio fino al centro i germi diminuiscono fino a perfetta trasparenza del vetrino.

Il coprioggetto si tiene quindi con pinza di Cornet e vi si versano parecchie gocce di mordente. Il liquido sul vetrino deve essere abbondante, però bisogna cercare di non farlo passare di sotto. Si espone così alla fiamma piuttosto piccola ad altezza di 10-15 cm., per la durata di 30 secondi.

Indi si lava sotto un abbondante getto di acqua; si mordenza una seconda volta riscaldando per l'istessa durata e rilavando abbondantemente. Si ripete l'operazione per una terza e se si vuole per una quarta volta sempre lavando abbondantemente dopo ogni mordenzatura, quindi si osserva il coprioggetto per trasparenza. L'anello deve assumere un colorito grigio-viola. Dopo ciò si colora con lo Ziehl fino ai primi vapori e prolungando l'azione della fucsina fenica per altro mezzo minuto fuori della fiamma.

Indi si lava abbondantemente e si deve ottenere quell'anello colorato in rosso-pallido ed il resto del vetrino limpido o con leggerissima tinta violacea, la quale se si lava molto abbondantemente e se il vetrino non si avvicina alla fiamma, non si produce. Bisogna avvertire che il coprioggetto prima di montarlo devesi pulire accuratamente nella superficie inferiore che è stata rivolta verso la fiamma anche per togliere quegli elementi dei liquidi adoperati per avventura passati sotto per capillarità attraverso la pinza o dai margini stessi del vetrino, i quali per l'azione del calore sono fortemente aderenti al vetro. Perciò bisogna stropicciare questa superficie su carta bibula bagnata tenendo all'uopo il vetrino per due margini liberi ed

opposti, tra l'indice ed il pollice e con la superficie da pulire rivolta in sotto. Così pulito il vetrino si rilava accuratamente e si monta in acqua. Se è riuscita la colorazione, si evapora l'acqua e si monta in balsamo.

All'osservazione microscopica in corrispondenza dell'anello, si nota una gran quantitàdi batteri, vicini uno all'altro, e con le ciglia intrecciantisi in modo da formare un vero reticolo. A misura che da questo cerchio ci allontaniamo verso il centro i germi sono più scarsi fino a scorgerne due ó tre in un solo campo. In tali condizioni i germi che non hanno perduto tutte o parte delle ciglia sono bellissimi.; essi presentano il corpo di un bel colore rosso e le ciglia di color rosso-viola pallido. Il corpo è molto ingrandito per la colorazione dello strato periferico del germe (capsula?) che con gli ordinari metodi non si colora nè si vede, e dal quale paiono partire le ciglia. Il campo d'osservazione in ogni punto presentasi disseminato di ciglia distaccatesi durante le manipolazioni.

Seguendo le norme di tecnica suesposte si è sicuri di ottenere sempre preparati bellissimi. Ma volendo procedere in fretta si può fare a meno di parecchie norme.

Difatti ho ottenuto colorazioni di ciglia senza diluizione del materiale portandolo direttamente con l'ansa sulla goccia d'acqua deposta sul copri-oggetto, essiccando il materiale alla fiamma, esponendolo all'azione del mordente quasi a contatto della fiamma e riscaldandolo fino ad ebollizione, ecc. Ma in tal maniera non si ottengono preparati che soddisfino l'occhio dell'osservatore, soltanto si può scovrire se il germe in esame possegga oppur no ciglia.

***

Questo metodo l'ho sperimentato su parecchi germi di cui presento i rispettivi fotogrammi. Le fotografie fatte in questo stesso Istituto sono libere da ritocco perchè i preparati sono abbastanza limpidi ed esenti da impurità per cui non occorse l'intervento dell'arte. Mentre invece è chiaro che in molti altri fotogrammi, specie in quelli che sono nei trattati, ci sono le vestigia dei ritocchi negli attacchi delle ciglia. Come si vede chiaramente i qui annessi fotogrammi stanno a dimostrare che con questo metodo le ciglia sono realmente ben appariscenti e bene conservate, nel mentre il preparato è molto nitido.

I bacteri colorati presentano differenze rimarchevoli nella quantità, forma e disposizione delle ciglia, ma per ora non credo opportuno di entrare in questa quistione che potrà essere oggetto di un lavoro completo sui batteri ciliati.

Aggiungerò solo che questo metodo, col quale viene anche colorata bene la capsula dei batteri, per la sua semplicità, per la sicurezza dei risultati, per la nettezza dei preparati mi sembra finora il più pratico di tutti. Nell'Istituto di igiene dell'Università di Roma è stato sperimentato da moltissimi colleghi e posso dire che raramente essi han perduto un preparato.

Con questo non voglio però escludere che necessiterà una larga esperienza prima di ritenere risoluta la questione importante del modo di colorare le ciglia con facilità, speditezza, costanza.

I batteri di cui presento il fotogramma sono i seguenti:

TAVOLA IV.

1° B. Tifo (fig. 1ª).
2° B. Sottile (fig. 2ª).
3° B. volgare (Proteus vulgaris) (fig. 3ª).
4° Vibrione del colera (fig. 4ª).

TAVOLA V.

5° B. Tetano (fig. 5ª).
6° B. dell'edema maligno (fig. 6ª).
7° B. del carbonchio sintomatico (fig. 7ª).

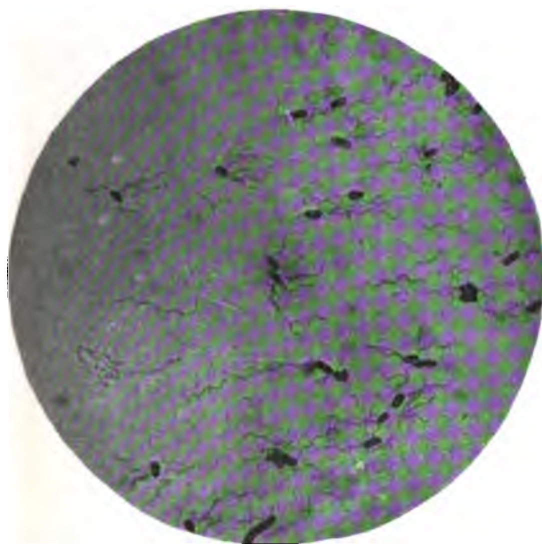


Fig. 1 - B. Tifo.



Fig. 2 - B. Sottile.

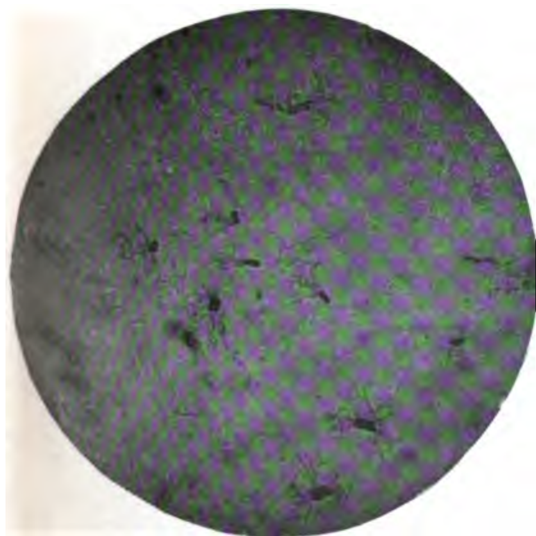


Fig. 3 - B. Proteus vulgaris.

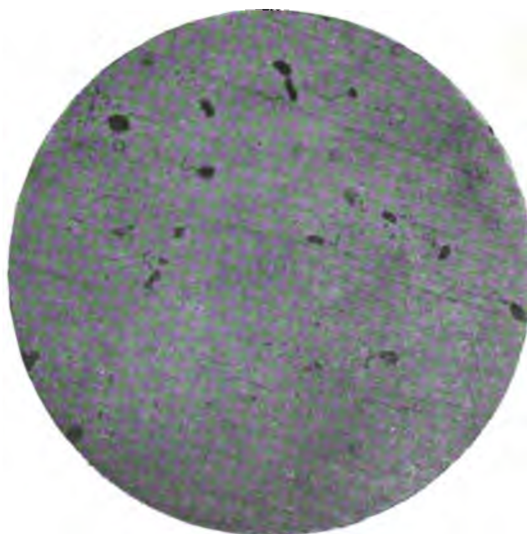


Fig. 4 - B. Vibrione del colera.



Fig. 5 - B. Tetano.



Fig. 6 - B. dell'edema maligno.



Fig. 7 - B. del carbonchio sintomatico.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

La malaria in Italia durante il 1902

Ricerche epidemiologiche e profilattiche

Riepilogo di **A. CELLI.**

Delle stazioni sperimentali, che nel 1900 e nel 1901 impiantammo dal Nord al Sud dell'Italia per lo studio epidemiologico e profilattico della malaria, alcune (Marano Lagunare, Bagnolo di Lonigo, Cumignano sul Naviglio, Marcianise) non poterono più funzionare; altre perciò ne aggiungemmo nel 1902 a Trecate (Novara), a Candia Lomellina (Pavia), a Lerino (Vicenza), nel Modenese, a Ostia (Agro Romano), a Vico di Pantano (Caserta) e ad Atella (Basilicata).

Come negli anni precedenti, il metodo delle indagini fu estensivo ed intensivo: funzionarono cioè varie stazioni di studio per le diverse regioni malariche; però in ogni singola stazione il materiale preso in esame fu sempre molto circoscritto per meglio raccoglierlo e controllarlo.

Riferirò, in breve, i risultati più notevoli ottenuti nella decorsa campagna antimalarica, e li metterò in confronto con quelli ottenuti da noi negli anni precedenti (1) e da altri osservatori nello stesso anno 1902. Farò così una sintesi dei lavori che, sotto la mia direzione, fecero i soci studiosi della Società per gli studi della malaria: ad essi lavori, pubblicati nel vol. IV degli *Atti*, rimando il lettore che voglia conoscere più dettagliatamente quanto espongo in questo riepilogo.

(1) Vedi Atti della Società per gli studi della malaria, vol. II e III, Roma, 1901, 1902.

PARTE I.

Epidemiologia della malaria.

L'annata epidemica del 1902 fu in generale ancora più mite di quella precedente. Ma non mancarono, come nel 1901, parecchie eccezioni.

Così nella palude Pontina e, in genere, nella zona littoranea dell'Agro Romano, l'epidemia fu in ritardo, ma, nell'autunno, fu più grave che nell'anno precedente. Fu pure grave, sebbene anche in ritardo, nel Grossetano. Nel Veronese, mentre a Vigasio e a Grezzano l'epidemia fu mite, quale da 14 anni non si ricordava, invece, tra i limitrofi comuni, fu grave, anche per l'abbondanza delle febbri estivautunnali, ad Isola della Scala, e, pel gran numero di terzane lievi, a Nogarole Rocca e a Trevenzuolo. Similmente in Basilicata, mentre in generale non fu grave, in Atella invece infierì una vera pandemia; tanto che il 70 % di tutta la popolazione, e in alcuni gruppi di case il 100 % ne ebbero a soffrire.

Mentre poi in generale, dal 1900, la malaria fu in declinazione, invece nel Modenese, per es. a Villa Marzaglia, continuò quell'elevazione progressiva che si era iniziata nel 1898. Così pure in Olanda l'espansione della malaria prevista dal dott. Schoo ha realmente avuto luogo, malgrado che le condizioni climatiche fossero, come vedremo, poco propizie.

Però nel fare confronti fra un'annata epidemica e l'altra, e in genere nel dar giudizio, volta per volta, sulla gravezza o no di una epidemia di febbri, bisogna tener conto di varii criteri.

Non basta cioè sommare il numero totale dei casi di febbre; bisogna, più ch'è possibile, distinguere le recidive dalle primitive infezioni: così in Atella la malaria fu grave più pel gran numero di recidive anzichè per quello, relativamente limitato, dei nuovi casi. E bisogna tener conto eziandio della specie parassitaria predominante e della sua virulenza: così a Brindisi avvenne che alla grave epidemia del 1900 ne seguì una gravissima nel 1901; e nel 1902 l'epidemia fu meno grave non pel numero totale dei casi, ma per la minor virulenza dei parassiti estivautunnali e comparativamente pel maggior numero di infezioni terzanarie lievi, che arrivando ad essere predominanti diedero così l'impronta di malaria mite anche altrove, per es. a Vico di Pantano.

Infine si deve pure indagare il modo come la curva epidemica si svolge: quando essa raggiunge un alto fastigio in un tempo relativamente breve, la gravezza epidemica impressiona più che quando lo stesso numero di casi viene più o meno regolarmente a verificarsi nei varii mesi dell'annata epidemica.

Sicchè *per giudicare anno per anno dell'intensità dell'epidemia di malaria in una data località, bisogna tenere separato conto delle febbri recidive e primitive, della specie e della virulenza dei parassiti, e infine del modo come la curva dell'epidemia si svolge.*

Dove poi in estese zone, come nell'Agro Romano, nel Veronese, ad Argenta, la campagna profilattica è da 2 anni vigorosa, è tuttavia prematuro attribuirle direttamente la mitezza della passata stagione, che fu così anche dove poco o nulla si fece per combattere le febbri. Quindi, in generale, data un'epidemia così variabile spontaneamente d'anno in anno, prima che dalla più completa e più riuscita campagna antimalarica si possa ricavare o vantare un effetto sicuro e durevole per un'estesa zona, bisogna sempre lasciar correre degli anni.

1) Distribuzione geografica dei parassiti malarici.

Con l'annata epidemica, complessivamente mite, coincise, per lo più, il predominio delle forme terzanarie lievi. Le quartane si mantennero, come sempre, uniformemente scarse.

In mezzo a regioni dove predomina d'ordinario la terzana lieve sono notevoli le isole di malaria grave, cioè con predominio di parassiti estivautunnali. Il che si rinvenne nel passato anno nella città di Mantova, e quest'anno anche in luoghi rurali, come vicino ad alcune risaie nel Vicentino, ad Isola della Scala e a Grezzano nel Veronese.

Venne anche sempre a risaltare la diversa virulenza dei parassiti estivautunnali. Questi nell'alta Italia sono in generale così miti che dànno la perniciosità raramente nei bambini, quasi mai negli adulti, nei quali le relative febbri spesso dalla sola manifestazione clinica e senza l'esame del sangue non si distinguono dalle terzane lievi.

Così avviene anche sul versante adriatico dell'Italia media; mentre sul versante mediterraneo corrispondente (Maremma di Grosseto, Agro Romano e Pontino) dominano i più virulenti parassiti estivautunnali, come nel Mezzogiorno.

E in genere le manifestazioni della virulenza di questi parassiti sono: la gravezza dei sintomi generali dell'infezione, la tendenza più o meno rapida alla perniciosità, la recidività ostinata ad inter-

valli più o meno lunghi, e la cachessia. Quei poveri e miseri cachettici che incontriamo di frequente nelle regioni di malaria grave, sono divenuti rarissimi o non si vedono più nelle suddette regioni di malaria più mite.

Alcuni, ma sempre rari, casi di *quotidiana vera* furono dal dott. Polettini riscontrati anche nel Veronese.

2) Recidività delle febbri di malaria.

A indagare questo fenomeno così importante dovremmo anzitutto avere a disposizione un sicuro *criterio di diagnosi della malaria latente*.

A tale scopo, messo ormai da parte il criterio erroneo dell'agglutinazione dei globuli rossi del sangue, ho fatto, insieme con Casagrandi e Carducci, nuove ricerche sull'emolisi ch'è un effetto indiscutibile dell'infezione malarica. e probabilmente potrebbe, in vario grado, perdurare in tutto il tempo che l'infezione persiste anche latente.

Non essendoci riuscito nell'anno scorso a mettere in evidenza questo fenomeno *in vitro*, per mezzo di una sierodiagnosi, partimmo dall'emoglobinuria sperimentale che si produce, quando si vuole, inoculando per via sottocutanea al coniglio il sangue di cane, e poi il siero di coniglio così trattato inoculandolo al cane, che ammala e muore di tipica emoglobinuria.

Nel siero di un sangue così emoglobinurico si può mettere in evidenza il potere emolitico *in vitro*, aggiungendogli un estratto di milza di cane normale, e facendolo agire sui globuli rossi del medesimo animale.

Ma questa emolisi *in vitro* col siero di sangue malarico, rispetto ai globuli rossi dell'uomo, non ci è apparsa, nè aggiungendo l'estratto di milza da stasi (per cardiopatia) e neanche l'estratto di milza perniciosa.

Quindi ci fu sinora *impossibile ottenere in vitro l'emolisi col siero di sangue malarico*. Forse per ottenerla occorrono più fattori concomitanti; e probabilmente uno se ne deve trovare nella milza (normale?), uno nel siero emoglobinurico, rispettivamente malarico, un terzo nei globuli rossi del sangue malarico od emoglobinurico.

E neppure ci fu possibile trovare *in vitro* nel siero di sangue malarico una qualche speciale globulina.

Quindi *sinora non abbiamo alcun criterio sierodiagnostico dell'infezione malarica latente*.

Neanche il *criterio microscopico o parassitario* ci può assistere. Già non sono ancora definitivamente note le forme destinate ad assicurare le recidive: e se, come pare, sono quelle sessuali, non sempre si possono vedere circolanti nel sangue nei lunghi intervalli apirettici; e nessuno potrebbe accettare come pratico il consiglio di

ricorrere nei casi dubbi alla puntura della milza, per fare una diagnosi non richiesta da un qualsiasi *periculum in mora.*

Certo nelle febbri estivo-autunnali primitive non appaiono subito, ai primi accessi, i gameti nel sangue periferico; e perciò quando se ne trovano c'è la presunzione si tratti di recidiva; ma purtroppo non in ogni recidiva se ne vedono. E poi nella febbre terzana lieve i gameti compaiono precocemente, dopo i primi accessi; e nella quartana sono sempre assai scarsi.

In generale si può anche dire che la recidività è più ostinata quando l'infezione è doppia o tripla; ma questo criterio non è che indiziale, perchè sono spesso ostinate anche le recidive di una infezione dovuta a una specie parassitaria unica.

Meglio del criterio microscopico ci può aiutare qualche volta il *criterio clinico*, quando cioè dopo l'ultimo accesso di febbre perdurano: malessere, debolezza, stato anemico, tumor di milza; in tal caso, giusta ogni ragionevole presunzione, può trattarsi di recidività. Se però, come non solo per le infezioni lievi (terzana mite e quartana), ma eziandio per le febbri estivo-autunnali, decorre un intervallo di varii mesi (6-12) in mezzo al più completo benessere e la febbre torna in luogo e in tempo di epidemia, non possiamo più decidere. E neanche vale, sia pure per le sole febbri estivo-autunnali, il fatto che di regola un'infezione primitiva è clinicamente più grave d'una recidiva, perchè non c'è oggi più alcun dubbio sulla possibile gravità, ed anche sulla perniciosità delle recidive di queste febbri.

Rimane perciò il *criterio di analogia.* A chiunque debba curare dei malarici ne sono accorsi di quelli recidivanti ostinatamente per mesi, e financo per uno o più anni. Ve ne sono bene spesso di coloro che una volta contratte le febbri, pur dimorando sempre in luogo salubre continuano a recidivare lungamente. Sarebbe necessario però che simili casi, controllati con l'esame del sangue, fossero accuratamente raccolti e messi in luce: è questo un lavoro che meglio di altri potrebbero fare i medici che esercitano in località salubri, ove tornano o si mandano a risanare gl'infetti da malaria. Si potrebbe così, dopo molte osservazioni, giungere a rischiarare questo problema così oscuro e così interessante della recidività.

Per ora si può dire che altrettante cause predisponenti alla recidività delle febbri malariche possono essere:

a) *Miseria alimentare* per cui i denutriti così difficilmente si liberano dalle febbri. È perciò che nelle popolazioni povere, in anni di scarsi raccolti, la malaria diventa, secondo Fortunato, una ma-

lattia costituzionale, come fa pena di vedere, p. es. nel Mezzogiorno, e come il Martirano ha descritto per Atella;

b) *Strapazzi* per lavoro eccessivo, p. es. durante i raccolti, dopo lunghe marcie, ecc.;

c) *Agenti reumatizzanti*, onde, p. es. a Vigasio, dopo un periodo di giorni burrascosi o piovosi s'è notato sempre un aumento del numero delle recidive. In Atella però in mezzo alla eccezionale siccità del 1902 furono pur moltissime le recidive.

d) *Cause morbigene concomitanti*: il Caccini, p. es., ha trovato (1) che l'iniezione di tubercolina ridesta la infezione latente da mesi, e fa sorgere nuovi accessi di febbre malarica.

Queste, ed altre cause che non conosciamo ancora e che urge indagare, devono regolare il

3) Decorso delle febbri malariche recidive.

Nel giudicare le quali, abbiamo sempre consigliato di tenere esatto conto dei casi più certi, relegando a parte quelli che per le incertezze diagnostiche ed anamnestiche rimangono più o meno dubbi.

Date le incertezze nella diagnosi e nella durata delle recidive, convenimmo intanto nel considerare come casi di nuova infezione quelli occorsi nei bambini nati dall'inverno precedente in poi, e in individui o provenienti da luoghi salubri, ovvero da due anni almeno esenti da febbri.

Tutti gli altri casi vennero posti nel novero dei recidivi o dei dubbi.

Or bene si è, così procedendo, confermato per la terzana lieve il fatto della recrudescenza preepidemica, primaverile, delle recidive; il che vale a congiungere indissolubilmente il vecchio col nuovo anno della rispettiva epidemia.

La recrudescenza preepidemica delle recidive di febbri estivo-autunnali, a guardar bene, non manca nemmeno al difuori delle regioni del Mezzogiorno, ove fu messa in così chiara evidenza dal Martirano e da altri. Avviene però che spesso precede di poco, al principio dell'estate, lo sviluppo della nuova epidemia, e da questa perciò non si distingue nettamente. In ogni modo il decorso di queste recidive può essere raffigurato da una curva in progressiva elevazione dal luglio all'ottobre-novembre, e da questi mesi in poi, in progressiva discesa fino al giugno-luglio. Nel Mezzogiorno e forse anche ne-

(1) Comunicazione orale.

Vicentino l'elevazione di queste recidive anticipa, e perciò si distingue più nettamente dalla nuova epidemia delle nuove infezioni rispettive.

Anche la quartana ha la recrudescenza preepidemica delle sue recidive ostinate: se, come alcuni osservarono, la terzana lieve e la quartana abbiano una seconda recrudescenza delle loro recidive in autunno, dev'essere confermato ancora.

È interessante il vedere come *anche negli anni di malaria mite persistono le recidive.* Così a Vigasio (Veronese), secondo le accuratissime osservazioni del dott. Polettini, l'impronta epidemica nel 1902 fu data specialmente da recidive. E in Atella, dove, come dicemmo, infierì nello scorso anno una vera pandemia, di 59 bambini nati dal 1° gennaio al 30 novembre se ne infettarono solo 9, cioè 6 fra luglio e agosto, due in settembre, uno in ottobre, mentre è noto che l'infezione malarica dei bambini nati nell'anno è l'indice più sicuro della gravezza o no della nuova epidemia. Seguendo appunto questo indice, il Martirano in Atella potè dimostrare che proprio nel settembre, quando era al massimo l'epidemia, giudicando dal numero totale delle febbri, era invece minima la propagazione del nuovo contagio. Il che, messo in rapporto con la scarsità degli anofeli specialmente nelle abitazioni colpite, e in genere in tutta quella regione, ov'è così scarso il paludismo, confermava la diagnosi di epidemia prevalentemente di recidive come negli anni anteriori se n'erano vedute a Trinitapoli, a Cetraro e a Brindisi.

Quest'anno si è potuto constatare che *le epidemie di recidive si sviluppano anche in altre regioni d'Italia, al di fuori del mezzogiorno.*

4) Inizio e durata dell'anno epidemico.

Da noi, come pure in Olanda, si verificano, sebbene assai rari, casi di febbri nell'inverno, in persone che nei due anni precedenti non avevano manifestato alcun segno di malaria. Questi casi possono attribuirsi o a nuova infezione, per punture di zanzare ancora infette, oppure devono attribuirsi a lungo periodo d'incubazione, o infine debbono considerarsi come recidive di una prima infezione così mite da essere decorsa inosservata.

In ogni modo *le rare od eccezionali febbri primitive d'inverno devon esser riguardate come l'ultima propagine della precedente annata epidemica.*

Ma più interessanti, per stabilire l'inizio dell'anno epidemico,

e i limiti fra una epidemia e l'altra, sono i *casi di nuove febbri in primavera.*

Anzitutto queste non son mai le estivo-autunnali, o le quartane, ma esclusivamente le terzanarie lievi.

Casi nuovi, o primitivi di tali febbri in aprile e maggio furono ormai osservati dovunque, dall'alta Italia a Brindisi, come in Olanda; sicchè non c'è più dubbio che la terzana lieve è la prima e la più precoce manifestazione della nuova annata epidemica.

Però si discute ancora sulla genesi di queste nuove febbri di primavera. Dal momento che la temperatura esterna in tale stagione si ritiene non ancora sufficiente per la coltura degli emosporidii nello stomaco delle zanzare, e in questi insetti che ibernano l'infezione emosporidica contratta nell'autunno innanzi si crede che si vada estinguendo durante l'inverno, resta sempre il dubbio che i nuovi casi di primavera siano ancora manifestazioni recidive di febbri contratte nell'antecedente anno epidemico e rimaste latenti o poco avvertite.

A risolvere la questione, occorre di raccogliere accuratamente i *casi di malaria primitiva primaverile in bambini nati dal gennaio in poi.*

Un caso tipico di questo genere mi venne indicato da mia moglie che lo osservò in un ambulatorio di bambini.

Agnesi Angelina nacque il *20 febbraio* 1902.

La sua famiglia abita in via Flaminia (località malarica) ed è tormentata da febbri. Essa ammalò il *20 marzo* con febbre quotidiana e disturbi gastrointestinali; per questi era inutilmente curata, quando mia moglie dall'anemia grave ebbe il sospetto si trattasse di malaria. Difatti l'esame del sangue fatto il 24 marzo dimostrò i parassiti della terzana lieve (schizonti e gameti).

Trattavasi dunque d'un *caso indubbiamente primitivo di terzana lieve nel mese di marzo.*

Sarà interessante cercare se anche altrove sorgono questi casi di malaria primaverile, che, per quanto rari, pure possono nei bambini nati nell'anno facilmente nascondersi sotto la sindrome del catarro gastrointestinale.

Ad ogni modo non possiamo più dubitare che *la terzana lieve è una epidemia ad inizio primaverile.*

E tale è nell'alta Italia *l'epidemia di malaria nei mondariso.*

Questo lavoro, faticoso e penoso fra l'acqua, di mondare il riso dalle piante eterogenee si fa da squadre di contadini che scendono per solito da lontano e da luoghi salubri.

Dura 40-50 giorni e d'ordinario termina a S. Giovanni, cioè il 24 giugno, al principio dell'estate.

Il dott. Locatelli ha seguito da vicino la squadra che da Stradella (luogo salubre e in collina) era scesa nelle risaie di Lomellina, nel maggio e giugno del 1902, cioè in luoghi ed in anno di malaria mite. Erano 280 questi poveri emigranti: 26 di essi dovettero sospendere il lavoro, e tornarsene a casa, secondo il giudizio dei medici del luogo, la maggior parte con le febbri.

Degli altri 63, accuratamente osservati dal dott. Locatelli, dopo ch'erano tornati a Stradella, 18 erano malarici dall'anno avanti, e durante il lavoro ricaduti infermi; 45 furono i casi primitivi cioè nientemeno che il 71 per cento, una proporzione quindi assai elevata in rapporto con la stagione di primavera e coi luoghi di malaria mite dove furono contratte le febbri.

L'esame del sangue in 22 casi, nei quali fu positivo, diede: nessuna quartana, 19 terzane lievi, 3 sole terzane gravi, probabilmente contratte verso il principio dell'estate.

Cosicchè *fra i mondariso di Stradella si sviluppò un'epidemia primaverile, prevalentemente di terzane lievi primitive.*

Sarà molto interessante studiarne ancora queste epidemie dei mondariso.

5) Decorso delle epidemie di febbri e in ispecie delle singole epidemie di terzana lieve, terzana grave e quartana.

I rispettivi tipi epidemici così come vennero da me stabiliti, furono colle ricerche del 1902 confermati: abbiamo dunque certamente tre principali tipi epidemici: Nord Europa, Nord Italia e Sud Italia.

Queste differenze risaltano bene quando si tenga conto complessivamente di tutti i casi, recidivi e primitivi insieme.

Se però nelle diverse parti d'Italia si tien conto separatamente, anno per anno, soltanto delle nuove infezioni, si osserva che il decorso delle tre epidemie di terzana lieve, terzana grave e quartana non è molto differente nelle diverse parti d'Italia.

La *terzana lieve* è sempre la prima a incominciare, di primavera, e la prima a raggiungere il suo acme; questa sua precocità fu evidente così nelle regioni più nordiche, come in Terra di Lavoro e nel Brindisino: *a fortiori* dunque essa può dirsi un'*epidemia anche primaverile.*

La *terzana grave* e la quotidiana vera (assai scarsa) formano sempre un'*epidemia propriamente estivo-autunnale.*

La *quartana* infine è un'*epidemia prevalentemente autunnale.*

6) Vita delle zanzare in rapporto con l'epidemia di malaria.

Si è confermato che paludismo e anofelismo non sono sempre in proporzione diretta con la estensione e la gravità dell'epidemia di malaria; cioè mentre questa proporzionalità si verificò, in generale,

nella valle del Volturno, si ebbe invece una proporzione inversa in Basilicata (Atella) e in Sicilia, ove a pochissimo paludismo, certe volte limitato al letto dei torrenti o di piccoli fiumi, e quindi a poco anofelismo corrisponde molta o moltissima malaria, anche grave.

Così a Brindisi l'anno scorso le zanzare furono poche a causa della siccità eccezionale, eppure il numero dei casi nuovi fu alto come nell'anno prima, con diffuso e persistente paludismo e quindi con molte zanzare.

Anche nella Lombardia (Como), si è osservato da Galli Valerio un focolaio di paludismo e anofelismo con malaria poca e a lunghe intermittenze.

Nel Modenese, dove in epoche passate infierivano le perniciose, ed oggi le estivo-autunnali sono così lievi da non costringere certe volte nemmeno ad abbandonare il lavoro, si nota la tendenza che, assai spiccata, i focolai di malaria hanno a localizzarsi; ad esempio nella valle del Secchia, il comune di Rubiera ch'è subito al di là di questo fiume, dirimpetto a Villa Marzaglia, negli ultimi anni molto colpita da malaria, non ne ha risentito nulla o quasi, pur essendo in evidenti condizioni di subire il contagio.

Accurate ricerche storiche del dott. Ghigi hanno dimostrato che *il paludismo senza malaria fu già messo in rilievo da Strabone*, il quale si meravigliava che non dominassero le febbri in Ravenna, ad onta che le paludi fossero d'acqua dolce e l'acqua del mare (che oggi sappiamo essere larvicida) vi entrasse in piccolissima parte. Questo paludismo senza malaria deve essersi mantenuto per tutto il tempo in cui Ravenna fu la sede dell'Impero Romano, e poi, con Teodorico, del Regno d'Italia; nei secoli di mezzo invece il paludismo fu accompagnato da malaria pestilenziale (1), che perdurava nel secolo XVI, quando Clemente VII la scelse come luogo di deportazione dei ribelli, e poi si mantenne fino a tutta la 1ª metà del 1800, quando le perniciose, le cachessie palustri erano ovvie; oggi invece, pur essendo ancora molte le paludi, e parecchie le risaie attorno alla città, la malaria è divenuta, con tutto ciò, lieve e scarsa.

Intanto possiamo dire che *l'anofelismo senza malaria può essere uno stato precario.*

Difatti nell'ultimo triennio il Pasquini ha seguito accuratamente negli anni 1900, 1901 e 1902 una progressiva risurrezione della ma-

(1) Secondo Fortunato, Dante morì in Ravenna, la notte del 13 al 14 settembre 1321, di perniciosa, presa lungo le valli di Comacchio, reduce dall'ambasceria fatta a Venezia per conto di Guido Novello da Polenta.

laria autoctona in Valdichiana, che dopo tanti lavori di bonifiche, ma con tanto superstite paludismo era dopo il 1830 ben risanata.

Lo studio più accurato di simili fatti epidemici porterà nuova luce sui rapporti intimi tra zanzare e malaria.

7) Rapporti tra infezione emosporidica degli anofeli ed epidemia di malaria.

Nel 1902 fu l'infezione degli anofeli straordinariamente scarsa. P. es. a Vico di Pantano se ne trovarono infetti soli 3 su 630 che furono esaminati.

Di pari passo procedette, secondo Labranca, la scarsezza delle infezioni primitive. Perchè mai con tanti recidivi del 1902 e in molti luoghi con tante zanzare furono così pochi i casi nuovi di malaria? P. es. a Vico di Pantano ce ne furono appena il 10 per cento in confronto del 90 per cento di recidivi.

Certo, come non mancarono i gameti e le zanzare, così anche non mancò la temperatura propizia durante almeno tutto l'estate e buona parte dell'autunno.

E quindi *per spiegare l'epidemiologia della malaria s'impone sempre più l'ipotesi che le zanzare come l'uomo possano godere, verso i parassiti della malaria, un'immunità naturale od acquisita, assoluta o relativa, stabile o temporanea.*

Abbiamo già detto che molto può variare, per ragioni che non conosciamo, la virulenza dei parassiti della malaria grave. Possono forse anche le zanzare stesse esercitare su di essi un'azione attenuatrice?

Tutte queste ipotesi impongonsi all'attenzione ed alla indagine poichè tutto fa credere che *per ispiegare le epidemie di malaria ove grave ove lieve, le annuali oscillazioni periodiche, l'attenuazione e perfino la scomparsa della malaria, ci sono ancora da risolvere altrettanti problemi di biologia applicata alla epidemiologia.*

Anche *i costumi delle zanzare* devono essere studiati in relazione col potere che questi insetti hanno di pungere l'uomo a preferenza degli animali e viceversa.

Venne intanto confermato dal dott. Schoo che l'infezione emosporidica eventualmente contratta alla fine dell'anno epidemico si va estinguendo nell'inverno; cosicchè nell'aprile e maggio non si rinvengono più anfionti dentro lo stomaco, nè sporozoiti dentro le ghiandole salivari. Sicchè sarebbero le febbri recidive il solo anello di congiun-

zione fra l'una e l'altra annata di epidemia. Però i casi indiscutibili per quanto rari, di malaria assolutamente primitiva al principio della primavera (marzo, aprile) come si potrebbero spiegare se non si ammette che qualcuna delle zanzare inficiatasi nell'autunno precedente possa ancora nel marzo o almeno durante l' inverno conservare e trasmettere l' infezione?

8) **Agricoltura e malaria.**

Fu specialmente studiata la *correlazione fra risaie e malaria.* Or bene è certo che nel Novarese e nel Biellese la diffusione rapida e grave della malaria coincise coll'apertura, fattasi 10 anni or sono, di nuovi canali d'irrigazione e con la consecutiva coltura del riso. Come avviene di tutte le infezioni che colpiscono località prima immuni, si svilupparono epidemie, anche con perniciose, negli anni 1899-1901, fino a dovere in alcuni comuni sopprimere le risaie. Così nel Modenese, e più in ispecie nel territorio di Carpi, la malaria è comparsa nel 1898, contemporanea alla prima concessione di risaie, e poi andò, coll'estendersi di queste, progressivamente aumentando.

Quest'aumento di malaria dev'essersi avuto anche in Lomellina, quando si allargò la coltivazione del riso; ma poi, ad onta dell'estendersi della risaia, la malaria da grave e diffusa divenne sempre più mite e più scarsa.

E ciò al contrario di quanto è accaduto nel basso Veronese ove, secondo il Polettini, le risaie furono impiantate in epoca remota — le più recenti per es., a Vigasio, datano dal 1672 — eppure la malaria si mantiene ancora e si è forse mantenuta sempre con una stazionaria intensità. Qui però non la sola risaia, ma anche altro paludismo sono fomiti di malaria. Ad ogni modo *i rapporti fra risaia e malaria non sono sempre e dovunque gli stessi:* in certi luoghi (Lomellina, Ravennate), l'attenuazione progressiva della malaria si ebbe con tutta la risaia; in altri luoghi (Veronese) no. Ad ogni modo il fatto che con tutta la risaia si può nell'Italia superiore e in parte dell'Italia media (versante adriatico, provincia di Lucca) conciliare una malaria scarsa e mite ci deve trattenere dal domandare, come taluni fanno, la soppressione sempre e dovunque della coltura del riso, la quale è pure così rimunerativa e richiede tanta mano d'opera.

Certo nel Parmense l'abolizione delle risaie, alle quali si potettero, per fortuna, sostituire colture intensive asciutte, portò una rilevante e indiscutibile diminuzione e quasi scomparsa delle feb-

bri (1); così pure Gazzo Padovano, 10 anni or sono ricco di risaie ed uno dei più temuti focolai di malsania, oggi, dopo soppressa questa coltivazione è, secondo Peserico, risanato completamente; ed altri simili e salutari esempi non mancano. Però è certo altresì che *la risaia non si oppone all'attenuazione e certe volte, come nel Lucchese, alla quasi scomparsa della malaria, e nemmenò si oppone alle oscillazioni ed attenuazioni periodiche negli anni di epidemia, anche altrove mite.*

E quindi se dobbiamo, più ch'è possibile, opporci all'apertura di nuove risaie, che è accompagnata sempre da molta estensione e gravità di malaria, dobbiamo ancora studiare più a fondo i rapporti fra risaie e malaria, per vedere se e quando e come si può giungere a conciliare questa coltura assai redditizia con l'attenuazione e perfino con la scomparsa della malaria.

Intanto possiamo e dobbiamo far tesoro di tutti i mezzi profilattici più efficaci e più pratici.

Si è poi definitivamente assodato dal Galli Valerio che la canepa e il lino anche delle Alpi (Valtellina) hanno proprietà larvicide, nel tempo della loro *macerazione*. E solo se i maceri sono tali che i prodotti di fermentazione non arrivano a concentrarsi perchè si rimescolano con acqua corrente, possono non essere, come d'ordinario, la tomba delle larve degli anofeli. Quindi nel tempo della macerazione l'abbondante ricambio d'acqua è più dannoso che favorevole alla propagazione della malaria per opera delle zanzare.

La *coltura irrigua ad agrumi*, così com'è fatta in Sicilia, non pare di per sè, giusta le ricerche di Paladino-Blandini, fomite di malaria; anzi negli agrumeti le zanzare aeree incontrano come un ostacolo al loro diffondersi.

A spiegare come la *coltura intensiva* potentemente contribuisce a discacciar la malaria da una località, si è voluto attribuire una gran parte del merito agli animali nelle stalle, ove piuttosto che nelle abitazioni coloniche vanno ad accumularsi le zanzare (2). Conosciamo però luoghi di malaria gravissima (Atella) dove in poveri tuguri uomini ed animali convivono, e nel Veronese abbiamo case e villaggi rurali con malaria grave (Isola della Scala) vicino a case e villaggi rurali con malaria mite (Nogarole Rocca, ecc.), com'è mite alle porte di Mantova, nella qual città invece è stata e si mantiene grave.

(1) V. dott. Oliari. *La malaria in provincia di Parma dopo la soppressione della coltura del riso.* — Parma, 1903.
(2) V. Bonservizi. *Malaria ed animali domestici.* — Milano, 1903.

Infine, quanto alla *vegetazione palustre* si è potuto constatare che sia quando i canali o i fossi vengono ripetutamente spurgati dalle erbe, sia quando alla superficie dell'acqua è spesso e continuo lo strato erboso (p. es. di *Lemna palustris*, e di *Azolla caroliniana*) si ha egualmente un *habitat* sfavorevole alla vita delle larve.

Lo spurgo dei canali può contribuire in alto grado a liberare dalle anofele e fino un certo punto anche dalla malaria una località che sia già sottoposta a una efficace bonifica idraulica e agricola, e viceversa il trascurare questi lavori di spurgo può compromettere od annullare le migliori bonifiche.

9) Altre cause predisponenti o non alle epidemie di malaria.

Anzitutto l'*immunità* naturale è così scarsa che nessuno o quasi degli abitanti nelle zone di malaria grave ne viene risparmiato, prima o poi, nella sua vita.

Sono però i bambini che pagano più lungamente il malefico tributo: p. es. in Atella su di 165 febbricitanti, ben 114 erano bambini sotto i 10 anni (anzi il 50 per cento di essi avevano da 2 a 5 anni) e soli 45 avevano da 10 anni in su. Nei bambini è anche più frequente che non si creda, la perniciosità, simulantesi dietro i disturbi a carico del sistema digerente o nervoso; e così irriconoscibile è più micidiale.

Devono essere ancora studiati più a fondo *i rapporti fra malaria e meteore*. Bisogna cioè separatamente porre in confronto con le vicende, p. es. della temperatura, le tre distinte epidemie di terzana lieve, di terzana grave e di quartana.

Così in Olanda, dove sola ora domina la terzana lieve, nel 1902 la temperatura minima fu sopra i 16° per 21 giorni soltanto, e la massima superò i 20° per soli 9 giorni: eppure l'epidemia fu molto più estesa che nell'anno precedente che fu più caldo.

E poichè da noi pure la prima a comparire nella primavera è la terzana lieve, ne viene il sospetto che possano i relativi emosporidii coltivarsi a temperatura più bassa di 16°, come finora si è ritenuto, impiegando magari per la maturazione un più lungo tempo. Occorrono perciò su questo punto nuove ricerche sperimentali.

Nell'anno passato la stagione calda fu in ritardo di circa un mese, e corrispondentemente si ebbe dapertutto un ritardo nella esplosione dell'epidemia, più manifesto per la terzana grave.

Ma uno studio esatto di meteorologia applicata alla malaria non si potrà fare se non dopo parecchi altri anni di osservazioni, e quando, beninteso, con ogni scrupolo i casi certamente primitivi

verranno separati da quelli dubbi e certamente recidivi delle 3 suddette e ben note specie d'infezioni malariche.

Infine vennero nel 1902 sempre più in evidenza *i rapporti fra malaria e condizioni sociali:* i più colpiti furono dovunque i braccianti più poveri; è in questi che per la mancanza di cura, per la miseria alimentare, dura l'infezione più a lungo. Il noto proverbio che dice: « La malaria sta nella pentola », è vero nel senso che anche i ricchi, i ben nutriti non sfuggono, quando vi si espongono, al contagio, ma con la cura e la buona nutrizione se ne liberano presto, e non ne risentono mai quell'azione deleteria che conduce alla cachessia.

Evidentemente poi i lavori agricoli predispongono alle febbri sian nuove, siano recidive: si è rivisto così che dove si coltiva la risaia il maggior numero di febbricitanti si ha nei mesi quando più ferve il lavoro, cioè a maggio e giugno, quando si fa la mondatura del riso, e in agosto e settembre, quando se ne fa la raccolta.

Certe volte anche più della mietitura e trebbiatura del grano, la raccolta del granturco, e in ispecie il lavoro notturno dello spannocchiamento, coincidono con recrudescenze epidemiche. Così a Vico di Pantano la raccolta dei meloni prepara l'epidemia ch' ivi è in prevalenza autunnale.

In conclusione: *fra i più importanti problemi epidemiologici, che s' impongono ancora allo studio*, abbiamo:

1. La recidività in relazione con la diagnosi della malaria latente, e con le cause che la favoriscono.

2. Il paludismo e anofelismo in relazione con la scomparsa, la attenuazione, le intermittenze, le recrudescenze, o, in genere, con le variazioni autoctone dell'epidemia di malaria, e con le varie colture, in specie con le risaie.

3. I rapporti fra meteorologia e malaria, in ispecie fra temperatura e sviluppo dei vari emosporidi nello stomaco delle zanzare, fra temperatura e decorso delle singole epidemie di terzana lieve, terzana grave e quartana.

PARTE II.

Profilassi della malaria.

Nel 1902 come nel 1901 non avemmo altro di mira che provare e riprovare, senza alcun preconcetto, i vari mezzi da me e da altri proposti ed adottati dal 1889 in poi; e più specialmente la cura delle febbri recidive, la profilassi medicamentosa e la profilassi meccanica.

Di più vennero studiate, dal nuovo punto di vista etiologico, alcune grandi opere di bonifica idraulica.

Riferirò brevemente i risultati dei nostri studi:

A) Cura radicale delle febbri recidive.

Ancora una volta e da ogni parte è risultato come e quanto sia difficile la disinfezione completa e duratura del sangue nella infezione malarica, sopratutto in certi casi di recidiva.

Purtuttavia, come avevo proposto nella mia relazione precedente, venne ripetuto anche nel 1902, coi dovuti controlli, il *trattamento delle recidive nel periodo preepidemico* per misurare ancora una volta con precisione se e quanto possiamo ricavarne di beneficio reale, nel senso di ridurre la nuova epidemia successiva.

Vennero usati, senza preconcetti, i migliori rimedi, incominciando dai sali di chinino, sotto varie forme, cioè in tabloidi, capsule opercolate, pillole, cartine, soluzioni.

La somministrazione del *chinino* (bisolfato, idroclorato, bicloridrato) in forma di *tabloidi*, per quanto avesse il giudizio e il favore dell'uso ormai dovunque generalizzato, fu non di meno sottoposta a ricerche sperimentali, per determinare il grado di assorbimento dell'alcaloide, dato in questa forma, ed il modo come avviene.

Già il Gualdi che facea largo uso di tabloidi nell'ospedale di Santo Spirito, avea notato che gli effetti fisiologici della chinina (ronzio agli orecchi, ecc.) si verificavano costantemente e regolarmente, e le feci degli infermi giammai presentavano frammenti di tabloidi rimasti indigesti. Ma era indispenbile il controllare sperimentalmente l'eliminazione dell'alcaloide per la via delle urine.

Or bene il prof. Iacoangeli dallo studio accurato di 3 casi ha potuto concludere che l'*assorbimento dell'alcaloide introdotto per bocca in forma di bisolfato in tabloidi, rispetto alla rapidità ed alla intensità, non presenta al-*

cuna differenza in confronto degli altri modi ordinari di somministrazione, in polvere cioè o in soluzione (1).

A sua volta il dott. Mariani (2) nell'ospedale di San Giovanni ha intrapreso uno studio anche più completo sull'assorbimento del chinino. Fra l'altro potè dimostrare che nelle 24 ore la chinina triidrata, quasi insolubile nell'acqua, si assorbe ugualmente bene che quando è data nella forma più solubile di bicloroidrato; questo, nella forma di tabloidi, si assorbe benissimo; i pasti a stomaco pieno, e la febbre quando procede senza disturbi gastro-intestinali non ostacolano l'assorbimento; la somministrazione quotidiana di chinino, sotto qualsiasi forma, ha per effetto un accumulo di alcaloide nel sangue, e nello stesso tempo evita anzichè produrre i fenomeni di chinismo; così, *mediante la somministrazione giornaliera, con dosi piccole, di chinino, si può ottenere col minimo mezzo il massimo effetto medicamentoso contro la malaria.*

I tabloidi suddetti, se rivestiti d'uno strato di zucchero, sono comodissimi perchè si possono ingoiare volentieri, senza il disgusto dell'amaro, anche dai bambini e dalle donne; se ne può fare largo uso in campagna perchè si trasportano e si conservano benissimo: si può graduare, con tutta esattezza, la cura e colorandoli con vari colori, come i confetti, si può prolungarla di molto col mutare il colore, suggestionando così i più ostili a prenderne, quando, troncati gli accessi, ritengonsi guariti. Sono utili e pratiche eziandio le capsule opercolate, molto usate nella campagna antimalarica del Grossetano, diretta dal prof. Gosio: ma ora che lo Stato prepara il chinino in tabloidi, non costano meno, e certo sono al gusto meno aggradevoli dei confetti zuccherati. Così dicasi delle forme pillolari del commercio.

Variammo la qualità del sale di chinino adoperato: i tabloidi erano o di bisolfato, o d'idroclorato, o di bicloroidrato: le capsule opercolate si riempivano di solfato di chinino: ma Giorgi e Pagano hanno osservato che (3) anche il solfato di chinino grezzo agisce clinicamente bene contro gli accessi di febbri malariche; ciò che, confermandosi, verrebbe a rendere molto meno costoso di ora il trattamento specifico dei malarici.

Dei rimedi cosidetti ricostituenti usammo, qua e là, arsenico e ferro sotto varie forme di pillole, granuli, acque naturali, goccie, o contemporaneamente al chinino, o separatamente sia nei giorni di somministrazione di questo specifico, sia in periodi alterni.

Col solo *chinino* si è fatta la campagna antimalarica nel Vicentino, nel Mantovano, nel Grossetano, nell'Agro Romano.

A *Lerino* (*Vicenza*) la dose media quotidiana di chinino era di gr. 1 a 1.50 al giorno, dopo la guarigione degli accessi febbrili; nella terzana lieve si continuava per 10 giorni, si sospendeva per 10, e si riprendeva per altri 5 giorni; nella terzana grave si riprendeva per altri 10 giorni.

Con tutto ciò, sopra 266 malati recidivarono 31 (11 %).

Nel *Mantovano*, e in ispecie nella città di Mantova, la Deputazione provinciale di Mantova ha distribuito senza risparmio e gratuitamente il chi-

(1) Atti della Società per gli studi della malaria, volume IV, 1903.
(2) Atti c. s., volume IV, 1903.
(3) *Policlinico*, anno IX, aprile 1903.

nino (idroclorato per gli adulti, etilcarbonato pei bambini) per mezzo dei medici condotti, con lo scopo di fare una bonifica umana preepidemica; eppur tuttavia la terzana lieve, che nelle sue frequenti recidive preepidemiche fu più curata, non scemò; scemò invece nell'epidemia del 1902 la terzana grave, che fu meno curata nelle sue scarsissime recidive preepidemiche, ma scemò pure altrove, dato l'anno di malaria mite, senz'alcun trattamento preventivo prima dell'epidemia.

Nel *Grossetano*, i dottori Pasquini e Giorgi, sotto la direzione del prof. Gosio, adottarono il trattamento di 2 grammi di solfato in capsule opercolate negli adulti, e 2 grammi di euchinino (etilcarbonato) nei bambini, un gr. per sera il sabato e la domenica di ogni settimana da maggio alla fine di settembre. Essi fecero anche in circa 100 recidivi nel periodo preepidemico una cura chininica intensiva per 15 giorni, seguita da un trattamento settimanale profilattico, come vedremo, per tutta la durata dell'epidemia.

E mentre curando con 1-2-3 dosi di chinino il solo accesso febbrile, come ancora si costuma da molti medici, ebbero il 74. 01 °/₀ di recidive, col trattamento suddetto settimanale essi ebbero appena il 7. 31 °/₀ di recidive.

È interessante eziandio che in *Val di Chiana* (Pasquini) nonostante la cura e la sorveglianza più rigorosa, caso per caso, di pochissimi casi sporadici (una diecina per anno 1900 e 1901) non si è potuto impedire la risurrezione di una, sia pur lieve, epidemia di malaria.

Anche il dott. Schoo in *Olanda* ha trovato che la cura preepidemica col chinino non ha nella pratica il successo come si era creduto e sperato.

Cure miste, cioè di *chinino e ricostituenti*, contro la recidività delle febbri malariche vennero praticate nel Veronese.

A *Vigasio* si adoperò idroclorato — in qualche bambino etilcarbonato — e un'acqua naturale ferro-arsenicale molto rinomata. Il chinino si dava per 8 settimane, in tutto in dose di 25-35 gr. a testa, e in metà dose nei bambini. Su 123 persone si fece la chinizzazione quotidiana per 55 giorni, e contemporaneamente poi si usò l'acqua ricostituente suddetta: con tutto ciò recidivarono 31 (25 °/₀). Su 283 si fece la chinizzazione discontinua, a settimane alterne, dando l'acqua ricostituente nella settimana in cui non si dava chinino; recidivarono 77 (26 °/₀). In tutto, dunque, su 406 recidivarono 108. E se di questi si poteva dire che 69 non aveano con rigorosa regolarità fatta la cura, 39 invece l'avevano fatta benissimo.

Si noti poi che ognuno dei recidivi ostinati fu curato per altre 7-8 settimane: eppure 3 estivautunnali e 4 quartane recidivarono ancora (1). Nella zona così energicamente curata nel periodo preepidemico si ebbe di primitive il 7. 73 °/₀ della popolazione; nella zona di controllo si ebbe 11. 35 °/₀, quindi una differenza minima, dato l'anno di minima epidemia anche in comuni limitrofi.

---

(1) Nella prima parte di quest'anno 1903 recidivarono ancora 20 che parvero guariti in seguito alle cure assidue e protratte del 1902. Così può in qualche caso avvenire che la malaria persiste ma si mantiene latente pei mesi di cura, e poi a intervalli più o meno lunghi riappare nell'inverno o nella primavera successiva.

Nemmeno con le *misture pillolari di chinino*, *ferro e arsenico* si riesce sempre a guarire radicalmente tutti i casi di malaria.

Per esempio, ad Isola della Scala (1) di 130 individui che nel periodo preepidemico furono curati, seguendo scrupolosamente le istruzioni che accompagnano certe pillole commerciali di chinino, ferro, arsenico e principi amari, recidivarono 31 (23 %), e taluni recidivarono più volte, ad onta delle replicate cure. Su 88 di essi, che erano certamente malarici all'inizio della suddetta cura (ai 15 di marzo 1903) si ebbero 31 (35 %) insuccessi o recidive.

Anche a *Mozzecane* si notarono, come altrove, disperanti resistenze, specie di febbri estivautunnali. ad ogni cura.

Di 40, che nel 1901 avevano fatto uso delle suddette pillole, recidivarono 12 durante la cura, e 8 ancora nuovamente nella primavera del 1902.

Sicchè *le recidive a intervalli più o meno lunghi non si possono certe volte impedire neanche dopo le migliori cure chininiche o miste, protratte eziandio per un lungo tempo, nel periodo preepidemico e poi durante la stagione delle febbri.*

Aggiungasi la difficoltà di praticare in campagna la cura intensiva preepidemica in mezzo a popolazioni poco previdenti od apatiche, e si aggiunga anche la spesa relativamente elevata del chinino occorrente per lo meno in dose di 25-35-40 gr. a testa già prima che la stagione delle febbri incominci: con questa quantità del rimedio si può, come vedremo, fare tutta una cura profilattica per l'intera durata dell'epidemia.

Perciò per la nuova campagna del 1903 propongo di limitare ai soli febbricitanti le cure preepidemiche, e invece *per tutta la gente che è e può essere soggetta a infettarsi adottare sulla più larga scala possibile il trattamento quotidiano ovvero settimanale col chinino*, *o per tutto il periodo delle febbri* (popolazione stabile), *ovvero per tutto il periodo dei lavori in luoghi e mesi pericolosi* (popolazione avventizia). Oltre a proteggere come vedremo i sani, si comincia così col fare una *selezione dei più ostinati a recidivare;* così la percentuale dei recidivi, ad onta del chinino, diviene relativamente bassa, e quindi più lieve si riduce il lavoro che resta da fare per la *cura più assidua e protratta dei recidivi più ostinati.* Notisi che quanti recidivano ad onta della chinizzazione preventiva hanno per solito accessi brevi e non gravi, che cedono di solito aumentando la dose giornaliera di chinino per qualche giorno, e riprendendo poi il trattamento profilattico.

---

(1) V. Dott. GABBATO. *La malaria in Pontepossero ed Uniti* (Podere Ponti). Verona 1903.

E quindi *non è vero che l'uso preventivo delle piccole dosi di chinino abitui l'organismo in tal guisa da non aversi più l'effetto curativo delle dosi curative più elevate.*

Ad evitare poi più ch'è possibile le recidive, conviene anche fare la *chinizzazione pronta e protratta dei casi primitivi.*

A Vigasio con 8 settimane di cura protratta postaccessuale, dopo cioè la guarigione degli accessi febbrili, di 178 casi primitivi così curati, sino ad oggi, non recidivarono che 12, dei quali 8 affetti di quartana, notoriamente la più ostinata a guarire.

Nei modi precedentemente indicati si può sperare che l'*eredità dei recidivi che un anno epidemico trasmette all'altro venga mano a mano ridotta.*

***

C'è nessun rimedio più efficace del chinino per la guarigione radicale dell'infezione malarica?

L'industrialismo non ha saputo trovare che nomi nuovi per mascherare il chinino e venderlo più caro.

Tutti i vantati specifici antimalarici non valgono, quando valgono, che pel chinino che contengono.

Così tutte le misture, le miscele pillolari di arsenico, ferro e chinino sono ben lungi dall'essere dei rimedi infallibili, ch'esistono solo nel mondo della ciarlataneria: anch'esse agiscono, quando agiscono, essenzialmente pel chinino che contengono.

La vera cura anche dell'anemia postmalarica è la specifica mediante il chinino. Quante volte non vediamo col solo chinino guarire per incanto l'anemia malarica? Invece vediamo spesso quanto poco valgano i ricostituenti (arsenico, ferro) contro le anemie, la causa delle quali non conosciamo o non possiamo direttamente combattere.

E vediamo ogni giorno come nei malarici più deperiti, anche facendosi cure miste di arsenico, ferro e chinino, tarda il risorgimento organico.

Eliminata la causa che mantiene la distruzione dei globuli rossi, i poteri fisiologici dell'organismo provvedono prontamente alla riparazione del sangue. Anzi una buona alimentazione curativa sarebbe certo più efficace che qualsiasi ricostituente.

Abbiam detto, e qui giova ripeterlo, quale potente causa di recidività ostinata sia la miseria alimentare.

Non potendo purtroppo noi medici combattere nè questa nè le altre forme di miseria, daremo, in mancanza di meglio, nei casi di malaria con ostinata anemia, insieme al chinino anche arsenico e

ferro come per primo propose il Baccelli. Ma sceglieremo caso per caso i più economici ed utili preparati ferro-arsenicali (pillole, granuli, acque minerali), fra i tanti che in commercio abbondano. Io credo preferibile darli a parte, invece che uniti al chinino; altri preferiranno questa o quella delle tante pillole o misture; ma sull'azione coadiuvante di questi ricostituenti non ci faremo soverchie illusioni fino a ripetere l'esagerazione del Boudin di considerare per esempio l'arsenico quale uno specifico (1) antimalarico.

E *ci guarderemo bene dal proporre, e peggio dall'insistere, di trattare tutti i malarici acuti e cronici con la stessa panacea.*

Nella infezione malarica acuta non c'è talvolta chinino che basti, e che arrivi in tempo a salvare un pernicioso; l'anemia non è ancora accentuata, e quindi l'azione dei ricostituenti non è indicata.

Invece nella infezione malarica recidiva o cronica potremo dare anche, ma sempre subordinatamente al chinino, i cosidetti ricostituenti. Volta per volta al giudizio del medico tocca adottare e proporzionare la cura ai vari casi.

Certo in qualsivoglia campagna antimalarica di un solo rimedio non possiamo fare a meno, cioè del chinino. Senza i ricostituenti sono state fatte da noi e da altri, delle ben riuscite campagne antimalariche. Anche per combattere la recidività il più efficace mezzo è dare chinino e poi chinino più presto e per più lungo tempo possibile: e di far ciò lo consente il mitridatismo che questo sovrano rimedio aggiunge ai suoi tanti pregi (tonico, ecc.).

Questo mitridatismo è perfetto perchè si stabilisce presto, si può prolungare l'uso del farmaco per lungo tempo, o interrompere quando si vuole, senz'alcun disturbo, e senza che intanto l'abitudine dell'organismo alle piccole dosi scemi l'effetto curativo delle dosi più elevate.

Facilmente invece dell'arsenico se ne forma nell'organismo quell'accumulo (2), al di là di cui viene l'intolleranza, come si ha spesse volte nelle cure arsenicali protratte in ispecie nell'estate.

Mettere insieme questi due rimedi a così diversa azione (3) e servirsene sempre in tutti i casi, acuti e cronici di infezione malarica è contrario ad ogni buona pratica medica, e rende automatica

---

(1) L'arsenico non agisce neppure contro altre infezioni da protozoi (tripanosomiasi).

(2) A. FILIA. *Sull'eliminazione dell'arsenico somministrato ad alte dosi.* Gazzetta intern. di medicina pratica, 1902.

(3) Si noti che i composti arsenicali della chinina sono i più insolubili e quindi i più inassimilabili. Perciò l'arseniato di chinina ha, secondo Baccelli, anche ad alte dosi effetto minimo.

e generica un'arte che è così prudenziale e così individualizzata come la medicina curativa.

In conclusione, *per la cura radicale della malaria recidiva il più efficace rimedio è sempre il chinino: il segreto per vincere le febbri è quello di dare il chinino per lungo tempo dopo terminati gli accessi, utilizzando il mitridatismo ch'esso produce: in questa lotta contro la recidività un'alimentazione curativa coadiuverebbe il chinino forse più che i soliti ricostituenti; questi, in mancanza di meglio, si daranno quando occorrono a giudizio del medico, e preferibilmente separati dal chinino, nelle loro preparazioni più economiche, senza fondare molte speranze sulla efficacia loro contro un'anemia, che, come quella malarica, si vince vincendo la causa stessa mediante lo specifico veramente causale ch'è il chinino.*

B) **Profilassi medicamentosa.**

1. *Profilassi coi sali di chinino.* — Dopo i felici risultati che avemmo l'anno scorso dovunque facemmo la profilassi medicamentosa a base di chinino, e più dopo che adottammo in quest'anno i confetti o tabloidi zuccherati di chinino, molte difficoltà scomparvero nell'estendere questa profilassi.

I confetti sono reclamati con insistenza e son presi regolarmente anche da chi sta bene, perchè senza il disgusto dell'amaro danno appetito, forza, benessere.

A scopo di educazione igienica però conviene il primo anno trattare col chinino preventivo una parte della popolazione e lasciar l'altra per controllo: nell'anno appresso l'eloquenza dei fatti avrà annullato ogni diffidenza e pregiudizio, e questa profilassi avrà il suo più solido fondamento nella fiducia popolare.

Per graduare la *dose profilattica minima necessaria* i confetti usati furono o di 20 o di 15 centigrammi l'uno. Usammo per lo più il *metodo continuo*, *quotidiano o biquotidiano* secondo che si davano 1 o 2 confetti di chinino al giorno, 2 agli adulti, 1 ai bambini e ai ragazzi.

Si noti che dopo i primi 4-5 giorni d'ingestione quotidiana di chinino, cessa ogni fenomeno di chinismo (ronzio agli orecchi, tremori alle mani, vertigini); non si risentono più altri disturbi da parte del sistema nervoso e digerente, e si ha un perfetto mitridatismo; basta però un'interruzione anche breve perchè l'organismo riacquisti la sua squisita sensibilità pel rimedio.

Colla somministrazione giornaliera si ha un altro vantaggio; cioè nel sangue si stabilisce un'azione comulativa che secondo il

Mariani può salire al doppio della dose quotidiana: p. es., dopo 3-4-5 giorni di quotidiana ingestione di $^{1}/_{2}$ gr. chinino, la quantità dell'alcaloide corrispondente in circolo raggiunge quasi il grammo. Sicchè si evita il chinismo e si ottiene una relativa concentrazione del rimedio che col metodo discontinuo si raggiunge per 1-2 giorni soli.

Vero è che l'eliminazione del farmaco dura, anche secondo il Mariani, per circa 9 giorni dopo la somministrazione e così possono spiegarsi i benefici effetti preventivi che si possono avere anche col *metodo discontinuo*, cioè coll'uso *settimanale* del chinino somministrandolo nei giorni più automaticamente ricordatori, che per mettono la ripetizione facile, quasi macchinale, della presa del rimedio, cioè sabato e domenica, preferibilmente la sera; così durante la notte si avverte meno la molestia, che ogni volta ritorna, del chinismo. Questo è certo un inconveniente rispetto al metodo continuo, ma in compenso è minore il servizio di vigilanza che occorre per attuare il metodo discontinuo. Col quale uno stesso medico, in soli 2 giorni della settimana può fare un lavoro più estensivo. Spesso il sabato e la domenica i contadini ritornano alle loro case nei paesi dove il medico risiede, e può, se vuole, distribuire comodamente a scopo preventivo il chinino gratuito pei lavoratori.

L'intolleranza verso quest'uso protratto del rimedio specifico si ha solo in pochi individui, forse più col metodo discontinuo che con quello continuo.

Non è pratico da noi, con la nostra popolazione di campagna, il trattamento profilattico ogni 5-10 giorni.

Negli anni successivi, quando l'evidenza dei fatti avrà persuaso la gente, l'uno o l'altro metodo, quotidiano o settimanale, sarà scelto dagli stessi interessati a mantenere la salute ch'è la loro unica ricchezza.

Per ora il medico sceglierà il metodo che troverà più comodo e più facile a sorvegliarsi. Potrà egli anche mettere ancora una volta in confronto l'uno e l'altro metodo, per vedere quale più si adatti alle condizioni locali.

A lui sta il decidere se si deve aprire la campagna profilattica con una cura intensiva (ad es. per una o due settimane) di quelli che sono più soggetti a recidivare.

Per gli scopi della pratica non occorre, ma per gli scopi scientifici è bene tener nota a parte degli indenni da malaria e di coloro che ne furono affetti almeno 1-2 anni prima.

Il sale di chinino da prescegliere sarà il bisolfato o l'idroclorato che lo Stato distribuirà ai Comuni e alle Opere pie al minimo prezzo

di 8-10 cent. il grammo in tabloidi. Quando questi sono zuccherati non si sente più bisogno alcuno dell'etilcarbonato (euchinino) che adottai pel suo gusto non disaggradevole, e che alcuni ancora adottano, per la stessa ragione, nei bambini: il suo costo è però sempre eccessivo.

***

Col *metodo continuo o quotidiano* abbiamo avuto i seguenti risultati:

A *Muzzana* (Giussani) con 20-40 centigr. di idroclorato al giorno 20 persone così trattate rimasero immuni da febbri, che nella popolazione non trattata furono in ragione del 23 %.

A *Milano* (Bordoni Uffreduzzi e Bettinetti) con 25 centigr. di solfato al giorno dal 26 giugno all'ottobre, di 50 individui così trattati non ammalò nessuno. Fu soffocata così la malaria che era endemica nel personale addetto al cimitero di Musocco.

A *Trecate* (Bettinetti e Mossi) con 20 centigr. di idroclorato al giorno dal 15 luglio a novembre su 29 contadini si ebbero solo 5 recidive nell' agosto.

A *Vigasio* (Polettini) dal 1° luglio al 31 ottobre si diedero: 40 centig. di idroclorato al giorno agli adulti; 10-20 centigr. ai bambini. Di 53 così trattati 3 soli febbricitarono, due che aveano sospeso la cura, 1 che recidivò. In 147 sorvegliati per controllo si ebbero 75 recidivi, e 72 rimasero sani.

A *Mozzecane* (Vivenza e Mendini) di 39 trattati come a Vigasio 3 soli ebbero febbri lievi e rare.

A *Mantova* (Soliani) in 37 operai dell'industria ceramica con 40 centigr. al giorno di idroclorato, dal 1° luglio alla metà di ottobre non si ebbe nessun caso di malaria nè primitivo nè recidivo, ad onta che 17 di essi, dall'anno precedente infetti, avessero recidivato a brevi intervalli prima dell'inizio di questa profilassi. Notisi che furono scelti gli operai addetti al lavoro più faticoso dei forni: essi l'anno scorso ammalarono quasi tutti di febbri.

Ad *Argenta* (Orta) con 30 centigr. al giorno di bicloridrato di 73 curati 2 soli ammalarono; di 30 che presero centigr. 25-50 al giorno di euchinino, ammalò un solo, mentre nelle famiglie di controllo ammalò il 14 %.

A *Lunghezza*, nell'Agro Romano (Ambrogetti) durante la raccolta del grano di 52 persone trattate con gr. 0,25 di bisolfato al giorno ammalarono solo 3 per febbri recidive.

A *Foro Appio* in Palude Pontina (Mariani) su 72 sani curati con 30-40 centigr. di bicloridrato al giorno si ebbero 3 febbri della durata complessiva di 80 ore: in 18 che interruppero la cura si ebbero durante la interruzione 5 casi di recidiva e 2 di primitiva.

Ad *Ostia* (Maggi) fecero cura regolare (centig. 30 in media di bicloridrato al giorno) 398 individui; ne ammalarono soli 22, e cioè 19 di recidive, 3 soltanto di nuova infezione; fecero cura irregolare 106 e ne ammalarono 39 e di questi 18 erano recidivi o dubbi, 21 primitivi. Non fecero cura 185 e ne ammalarono 74, cioè recidivi o dubbi 62, primitivi 12.

A *Conca* (Speranza), luogo nell'Agro Romano celebre per la malaria grave, 40 operai (cosidetti aquilani) fecero la cura regolare preventiva di 30-40

centigr. (2 confetti) al giorno di bicloridrato. Uno solo ebbe un attacco di febbri recidive che fu subito troncato. Contemporaneamente nell'autunno la malaria a Conca, come nella confinante palude pontina, fu assai grave: degli altri operai, nelle identiche condizioni di luogo e di tempo, ammalò il 52. 5 %.

A *Gaudiano* (Potenza) 30 persone che dal 23 luglio al 23 ottobre presero da gr. 0,25 a 0,50 al giorno di idroclorato, ammalò una sola di febbre recidiva.

In complesso su 923 persone trattate con la somministrazione giornaliera di sali di chinino (25-50 centigr.) si ebbero 44 malati (4. 6 %), mentre per controllo si ebbe una morbosità variabile dal 12 all' 82 %.

***

Col *metodo discontinuo o settimanale* si ebbero i risultati seguenti:

A *Mozzecane* in 39 contadini con l'idroclorato in dose di centigr. 50 (bambini) a gr. 1.50 di cloridrato di chinino la cura in alcuni fu tardiva in altri breve perchè mal tollerata a causa dei disturbi da chinismo che si ripetevano ogni nuova presa di chinino: si ebbero quindi 12 che recidivarono.

A *Nogarole Rocca* (Martinelli) invece con gr. 1.50 di idroclorato per settimana, il sabato sera, su 28 così curati 2 soli febbricitarono, mentre gli individui di controllo febbricitarono in ragione di 20 su 27.

A *Corcolle* in Agro Romano (Ambrogetti) si somministrò da 0,50 a 1 gr. (secondo le età) per 3 giorni ogni 9 giorni nell'autunno a 209 persone che restarono immuni da malaria.

Nel *Grossetano* (Gosio, Pasquini, Giorgi) non vennero come nel Veronese per gli scopi della pratica distinti gli indenni da quelli che aveano sofferto le febbri e ne soffrivano ancora o n'erano presumibilmente guariti. Ebbene, complessivamente furono sottoposti al trattamento settimanale (2 gr. di solfato per ogni settimana) 1831 individui, dei quali ammalarono di febbri soli 170 (9.28 %), mentre in limitrofe regioni di malaria mite si ebbe per controllo una morbosità del 19.49 e nelle regioni di malaria grave dove il trattamento durò poco si ebbe il 40 % e dove non si fece cura alcuna si elevò al 69.57 %.

A *Strongoli* (Palaggi) con un metodo misto, continuo e discontinuo, e con bicloridrato gr. 0,50 al giorno, o gr. 1 ogni settimana, fra 26 persone così trattate si ebbero 7 recidive (1).

In complesso fra 2133 individui trattati con la somministrazione discontinua di chinino (da gr. 1-2 per settimana a gr. 3 ogni 9 giorni) si ebbero 191 malati (10 % circa), mentre per controllo si ebbe una morbosità variabile dal 40 all' 80 %.

---

(1) A Strongoli (Catanzaro) la profilassi venne fatta per iniziativa e a spese dell'on. Barone Giunti.

TABELLA I. — *Profilassi*

LUOGO dove fu applicata la profilassi	MEDICINALI adoperati	DURATA del trattamento	Num. delle persone trattate	Malati di recidive	Per cento
Muzzana (Udine) . . .	Idroclorato di chinina.	1 luglio-31 ottobre	20	—	—
Comune di Milano. . .	Idroclorato di chinina in confetti.	Dal 24 giugno in poi	50	—	—
Trecate (Novara) . . .	Idroclorato di chinina in confetti.	15 luglio-30 novembre	29	5	17. 4
Vigasio (Verona) . . .	Idroclorato di chinina.	1 luglio-21 ottobre.	53	1	2. 00
Nogarole Rocca (Verona) (metodo discontinuo).	Id.	?	28	2	7. 1
Mozzecane (Verona) . .	Idroclorato di chinina.	1 luglio-15 novembre	39	3	7. 6
Id. (metodo discontinuo).	Id.	Id.	38	12	31 5
Mantova.	Idroclorato di chinina in confetti.	1 luglio-15 ottobre	37	0	—
Argenta (Ferrara) . . .	Bicloridrato di chinina in tabloidi.	1 luglio-31 ottobre	73	—	—
Id. . . .	Euchinino	1 luglio-31 ottobre per 32 e per 52.	30	—	—
Grossetano (metodo discontinuo).	Solfato di chinina in capsule opercolate.	1 maggio, fine ottobre	1831	170	
Foro Appio (Palude Pontina).	Bicloruro di chinina.	Autunno	72	3	
Ostia (Are, Tre Piscine, Procoio, Calabresi) borgata, aquilani e monelli	Bicloridrato di chinina in confetti zuccherati da 0. 20 gr.	1 luglio-6 agosto 19 agosto-15 novembre 15 ottobre-15 novembre	398	19	4. 7
Lunghezza (Agro romano).	Bisolfato di chinina in tabloidi.	9 luglio-16 agosto	52	3	5. 7
Corcolle (Agro romano) (metodo discontinuo).	Id.	9 ottobre-6 dicembre	209	—	—
Conca (Agro romano). .	Cloridrato di chinina.	Durante l'autunno	40	1	2 5
Gaudiano (Potenza). . .	Bicloridrato di chinina in confetti.	23 luglio-23 ottobre	30	1	3. 3
Strongoli (Catanzaro) (metodo misto).	Id.	1 giugno-30 settembre	26	7	24.0
		Totali. . .	**3055**	primitivi e recidi	

medicamentosa con sali di chinina.

Malati di primitivo	Per cento	Controllo per cento	DOSI IMPIEGATE	ESPERIMENTATORI	*OSSERVAZIONI*
—	—	23. 00	20 a 40 cgr. al giorno.	Dott. Giussani.	
—	—	?	Prima 1 gr. e poi 0. 25 gr. al giorno.	Prof. Bordoni-Uffreduzzi e dott. Bettinetti.	
0	—	?	20 cgr. al giorno	Dott. Bettinetti e Mossi	
2	4.00	82. 2	10 a 40 cgr. al giorno.	Dott. Polettini.	I due casi primitivi si verificarono in persone che fecero cura incompleta.
—	—	74.00	Cura intensiva per 2 mesi e poi gr. 1. 50 per settimana.	Dott. Martinelli.	Il controllo fu fatto su 4 famiglie (27 persone) nelle stesse condizioni.
—	—	45. 9	20 a 40 cgr. al giorno	Dott. Vivenza e Mendini	
—	—	45. 9	Cgr. 50 a gr. 1. 50 per settimana.	Id.	
—	0	12 00	20-40 cgr. al giorno.	Dott. Soliani.	Fra i 37 sottoposti a profilassi uno ammalò per infezione gonococcica e tre per lievissimi disturbi intestinali durati 1–2 giorni.
2	2. 7	14. 00	Da 0. 25 a 0. 50 gr. al giorno.	Dott. Orta.	
1	3. 3	14. 00	Da 0. 25 a 0. 50 gr. al giorno.	Id.	
9. 28		69. 57	2 gr. di solfato per settimana.	Prof. Gosio, Dott. Pasquini e Giorgi.	
4 %		39. 00	30-40 cgr. al giorno.	Dott. Mariani.	Il controllo fu fatto sugli abitanti delle capanne vicine a quelle dove dormivano gl'individui curati.
3	0. 7	39. 5	Da 30 a 45 gr. al giorno.	Dott. Maggi.	Il controllo fu fatto su 185 persone.
—	—	33. 00	0.25 gr. al giorno.	Dott. Ambrogetti.	Il controllo fu fatto su sei pagliaroli.
—	—	8. 00	Da 0. 50 a 1 gr. per 3 giorni ogni 9 giorni.	Id.	
—	—	52. 5	Da 0. 50 a 1 gr. al giorno.	Dott. Speranza.	Il controllo venne fatto su 295 persone poste nelle identiche condizioni.
—	—	?	Da 0. 25 a 0. 50 gr. al giorno.	Sig. E. Fortunato.	
—	—	?	0. 50 gr. al giorno e 1 gr. ogni 7 giorni.	Dott. Palaggi.	
235	7.7 %	..			

attorno a Foggia, la Palermo-Trapani, furono risanate mediante questa profilassi.

Complessivamente nel 1902, col metodo ormai noto, si ebbero i risultati esposti nella Tabella II. Cioè sopra 6451 persone protette si ebbero in media appena il 2,6 % di febbri primitive, e il 9,5 % di febbri recidive.

Questi evidenti e ormai indiscutibili benefizi compensano ad usura dei piccoli incomodi che arreca la profilassi meccanica, cosicchè nelle persone di buon senso cominciano a entrare i nuovi costumi di questa nuova igiene della casa in luoghi di malaria.

Più incomoda e quindi più trasgredita è la protezione meccanica delle parti scoperte del corpo, ma per fortuna il numero delle zanzare infette, al di fuori delle case, è molto esiguo.

Anche la Direzione generale delle gabelle che nel 1901 aveva protetto 20 caserme di guardie di finanza, nel 1902 ne protesse 92: nelle prime 20 caserme suddette nel 1900 si erano avuti 207 casi di febbri, mentre, dopo la protezione, se n'ebbero soli 33 casi nel 1901 e 25 casi nel 1902: nelle altre caserme nel 1901 si erano avuti 634 casi di febbri, mentre nel 1902 dopo la protezione se ne ebbero 140, senza distinzione di casi primitivi o recidivi.

In quest'anno 1903 così l'Amministrazione delle ferrovie come quella delle gabelle estenderanno ancora questa profilassi.

Fra i contadini invece si è poco estesa la profilassi meccanica o perchè in campagna difettano o son malfatte le case, o perchè il genere di vita e di lavoro agricolo non ci si presta, o perchè è sempre un po' costoso il primo impianto (1) e costa anche la manutenzione ulteriore. In complesso perciò la profilassi meccanica è relativamente di lusso, e quindi adottabile solo nelle abitazioni degli agiati, nelle caserme dei soldati e delle guardie di finanza, e nelle case dei ferrovieri, dei custodi delle bonifiche, dei cantonieri, insomma degli operai che direttamente o indirettamente sono a servizio dello Stato (2). Poco è a sperare per ora che si estenda molto fra i contadini.

Anche in Olanda ad onta delle difficoltà locali, la profilassi meccanica si mostrò molto utile.

---

(1) La più costosa è la veranda, o il vestibolo: in piccole case costa più che la protezione delle finestre e delle porte. Ma per la protezione della casa, e più in ispecie delle camere da letto, ove è maggiore il pericolo di contagio, possiamo risparmiarla. Ne feci a meno ed ebbi pure eccellenti risultati nel 1899, nella prima applicazione che feci della profilassi meccanica lungo la ferrovia Roma-Cervara. Bisogna però che gli inquilini della casa protetta abbiano un po' più di circospezione.

(2) V. art. 5 della legge 2 novembre 1901.

TABELLA II. — *Profilassi meccanica.*

LUOGO dove fu applicata la profilassi	Numero delle persone protette	Malati di recidive	Per cento	Malati di primitive	Per cento	Controllo,	*Osservatore ed Osservazioni*
Novarese (Trecate) . .	25	1	4	—	—	—	Dottori Bettinetti e Mossi.
Veronese (Mozzecane).	64	5	7.8	2	5.9	66 %	Dottori Vivenza e Mendini. Prima che si applicassero le protezioni meccaniche i recidivi fecero la cura intensiva
Mantova.	23	—	—	1	4	12 %	Dottor Soliani. Due individui fecero la cura intensiva per 15 giorni, gli altri presero chinino per qualche giorno.
Ferrarese (Argenta). .	126	—	—	4	3.1	15 %	Dott. Orta. Alcuni recidivi fecero la cura al principio della stagione.
Ferrovie Meridionali .	3051	362	20.7	48	1.5	81.3 %	Dott. cav. Ricchi.
Ferr. ov. Mediterranee:							
a) Roma San Paolo Orbetello.	837	101	12.0	29	3.4	50 %	Dott. Martirano.
b) Orbetello Vada .	1211	111	10.9	55	4.5	dal 40 al 70 % secondo le località	Dott. Valagussa.
Ferrovia Sicula occidentale	514	14	2.7	30	5.8	61 %	Ingegnere Sbacchi. 394 persone furono protette con ritardo.
Totali. . .	**5851**	**594**	**10.1**	**169**	**2.9**		

In tutto sopra 5851 persone che, per quanto ci risulta, goderono nel 1902 di questa profilassi, complessivamente si ebbe solo il 2,9 °/₀ di nuove o primitive infezioni, e solo il 10,1 °/₀ (1) *di recidive.*

Certo è quindi che *dovunque siavi una casa, o un ricovero da poter proteggere dall'ingresso delle zanzare, la malaria finisce d'essere una epidemia domestica. Perciò dopo le mie prime applicazioni nel 1899, questa profilassi meccanica ha avuto ed avrà sempre il suo campo di azione.*

D) Distruzione delle zanzare.

B. Galli Valerio e J. Rochaz-De Jongh han fatto una lunga serie di studi e ricerche sulla resistenza e durata in vita delle uova, larve, ninfe ed imagini dei generi *culex* e *anopheles.*

Le *uova* resistono molto ai vari agenti fisici e chimici (freddo, caldo, disseccamento, movimento, liquidi zanzaricidi); molto meno invece resistono le *larve*: per queste ultime gli AA. hanno confermato — con poche e lievi differenze — le nostre osservazioni (2); e hanno aggiunto che realmente parecchi animali e i pesci in ispecie posson distruggere buon numero di queste larve di culicidi; è dubbio però se ciò verificasi in natura ove si trovano accanto alle larve di zanzare ben altri alimenti. In complesso le larve di culicidi ben più che le uova si mostrano sensibili ad una quantità di sostanze, e quindi su di esse più facilmente potrebbe dirigersi ogni tentativo di distruzione.

Sulla resistenza delle ninfe e delle imagini gli AA. hanno pure confermato le nostre osservazioni.

Ma con qualsiasi mezzo, e in qualsiasi stadio di vita si voglia e si possa intervenire, certo sarà molto difficile giungere a sterminare le zanzare.

Basta infatti la più piccola raccolta d'acqua per favorirne lo sviluppo a miriadi: e poi anche nello stadio larvale in cui è più facile aggredirle bisogna ogni 10-12 giorni nell'estate, ogni 15-20 nelle altre stagioni meno calde ripetere le disinfezioni delle acque.

Tuttociò da noi non è pratico. Forse in qualche caso, dopo che saranno complete e ben riuscite le grandi e le piccole bonifiche idrauliche, si potranno fare in piccola estensione le distruzioni suddette, ma si noti che con altri mezzi (diserbamento, cacciate di

---

(1) È da notarsi che all'opera risanatrice delle protezioni meccaniche si associò in alcuni tronchi ferroviari la cura assidua dei recidivi.

(2) V. CELLI e CASAGRANDI. Questi Annali, vol. IX, 1899.

acqua a intervalli brevi dai canali, colmate delle piccole pozzanghere...) si può arrivare più agevolmente al medesimo fine.

Anche all'Isola dell'Asinara (1), dove erano più propizie le condizioni, la petrolizzazione degli stagni, per mancanza di mezzi, è cessata.

Il Ross e i suoi collaboratori hanno raggiunto, con la distruzione zanzaricida, ottimi risultati a Sierra Leone.

Ma noi ci siamo sfiduciati a combattere la malaria con queste armi, cioè con la distruzione delle zanzare, alle quali, come a tutti gli insetti, la natura ha concesso la più rigogliosa conservazione della specie.

E) **Bonifiche idrauliche.**

Già prima di intraprendere un'opera di bonifica è utile far precedere la ricerca delle larve di zanzare, quando le acque, lungo il littorale, sono salmastre o salate: siccome in queste le larve di zanzare non vivono, si possono risparmiare certe bonifiche, e altre si possono circoscrivere soltanto alle acque dove le larve si possono allevare.

Gli studi del Perrone sulla distribuzione delle larve di anofele in tutte le acque stagnanti lungo il nostro estesissimo littorale del continente e della Sicilia (2), quelli iniziati nel 1902 dal Fermi e dai suoi collaboratori in Sardegna (3), faranno risparmiare opere inutili e perfezionare quelle indispensabili.

Nuove norme, che dovranno servire di guida ai progetti, all'esecuzione ed alla manutenzione delle opere di bonifica, furono da me proposte al Ministero dei lavori pubblici, che le ha accolte e diramate ai suoi ingegneri del Genio civile. Verso queste nuove norme d'igiene, che si fondano sulla biologia delle zanzare, dovranno orientarsi tutte le opere di bonifica da farsi, come fu già orientata la legge 7 luglio 1902 per ciò che si riferisce alla bonifica idraulica dell'Agro Romano, includendovi la piccola bonifica e la soppressione di quelle maledette casse di prestito ch'erano la norma nelle costruzioni stradali e ferroviarie.

Abbiamo anche studiato, dal nuovo punto di vista etiologico, alcune delle nostre più grandi e più famose bonifiche idrauliche già compiute o in via di compiersi.

---

(1) V. Fermi e Lumbau. Questi Annali, vol. X, 1900.
(2) Questi Annali, vol. XI e XII, ed Atti Soc. per gli studi della malaria, vol. II, III, IV.
(3) Atti c. s., vol. IV, 1903.

Fra le bonifiche per scolo naturale il Rossi ha studiate quelle delle così dette *paludi di Napoli*: qui al latifondo si è sostituita una coltura orticola intensiva; però molto paludismo è ancora superstite, e insieme molto anofelismo; eppur tuttavia la malaria è divenuta scarsa e lieve; meglio ancora, nel prossimo *Agro Acerrano* la bonifica è bene riuscita dal punto di vista non solo agricolo, ma anche igienico.

Le bonifiche per macchine idrovore furono studiate da Orta e Vistoli nel Ferrarese.

Vennero messe in confronto due bonifiche: una fatta col vecchio criterio che bastasse togliere le grandi paludi; l'altra col nuovo sistema che « bisogna toglier l'acqua del tutto dalla superficie della terra o metterla sempre in qualsiasi movimento » (1).

Con la prima, dato il grande bacino di bonifica, tributario di un solo impianto di idrovore, data la poca pendenza dei canali di scolo, ed essendo stato calcolato troppo basso il coefficiente idrometrico, invece di un unico e irregolare focolaio di malaria si hanno tante paludi lineari.

Quindi il risultato agricolo fu meraviglioso, il risultato igienico poco o nullo.

Con la seconda, limitando il bacino di bonifica, elevando il coefficiente normale a 1.49 per ha, ottenendo dalle macchine una prevalenza massima di 3.50-4 (2), con un sollevamento di 3000 litri al minuto secondo, e così aumentando la pendenza dei canali, si ottiene un prosciugamento completo anche nei periodi più piovosi; resta un po' d'acqua solo nel bacino o nella vasca di arrivo, innanzi alle macchine, ciò che non nuoce perchè lo specchio d'acqua, spurgato delle erbe e in moto con lo spirare del vento, non si presta ad allevare le larve, e in ogni caso vi si potrebbe introdurre l'acqua larvicida del mare.

Con un lavoro così bene ideato dal signor Magrini e così bene eseguito fa contrasto che nelle vicinanze, per incuria o per ignoranza, si mantengano ristagni di acque in cave di prestito, in fossati senza sbocco, in depressioni del terreno. Questa piccola bonifica deve completare la grande.

In ogni modo *il sistema dell'esaurimento meccanico può benissimo adattarsi ai nuovi criteri epidemiologici e profilattici della malaria, e condurre a una bonifica idraulica, igienicamente irriprovevole.*

Venne anche studiato come le vecchie bonifiche di questo sistema possono rendersi igienicamente più utili; occorre perciò di frequente ripetere l'espurgo o il diserbamento dei canali. Fatto ciò scompaiono per 10-12 giorni le larve: e quindi con una squadra di continua manutenzione dei canali, o almeno al principio della primavera, dell'estate e dell'autunno, si può ottenere un buon effetto larvicida.

Le bonifiche per colmate ideate da Leonardo da Vinci, e molto in uso in Italia per merito di grandi idraulici toscani e napoletani, vennero sottoposte ad esame nel Ravennate e nella Valle del Volturno.

Nel Ravennate, secondo il Ghigi, si hanno le più felici condizioni per simili bonifiche: fiumi pensili e assai facili a portare acque molto torbide;

(1) V. il mio opuscolo: *Malaria e bonifiche*. Milano, *Il Politecnico*, 1901.

(2) Le macchine, tipo Colferai, fabbricate da F. Tosi, possono arrivare a una prevalenza di m. 7, sollevando però soli 1500-1000 litri al secondo.

terreni bassi o vallivi, di sabbie o torbe sterili. La natura stessa con una memoranda rotta del Lamone insegnò il sistema; l'uomo ha seguito e perfezionato la via indicata dalla natura.

I risultati agricoli furono eccellenti, e buoni furono anche i risultati sanitari, ma contemporaneamente la malaria si attenuò anche dove il paludismo e l'anofelismo rimasero intatti.

Secondo il Rossi lo studio degli effetti igienici della bonifica nel bacino inferiore del Volturno dimostra che per ora essa fu insufficiente a risanare del tutto il territorio; anche dove, in certe parti, è completa da un cinquantennio, rimangono, sia pure limitate, acque stagnanti, perchè, dove permane il latifondo, mancano le opere complementari di piccole bonifiche, da farsi dai privati. Però in generale, col progresso delle bonifiche, da Aversa a Capua, ove è più completa, procedendo fino a Mondragone e a Vico di Pantano, ove la bonifica non è arrivata ancora, si può dire che per quantità e per gravezza si va pure attenuando la malaria.

Anche qui si vede che altre cause attenuatrici, indipendenti dal paludismo e anofelismo sempre un po' residuale, devono cooperare al miglioramento igienico.

Peccato però che questo sistema di bonifica impiega troppo tempo: esso è con tuttociò riservato ai casi, ne' quali le terre, da bonificare, sono sterili; altrimenti prima di seppellire tante ricchezze accumulate per secoli in terre palustri, conviene di studiare se, coi progressi della meccanica, con le odierne macchine più potenti e più economiche non si debba preferire l'esaurimento meccanico che, se ben fatto, può apportare immediati risultati agricoli e igienici.

Una delle più famose bonifiche miste, *per scolo naturale e per colmate*, quella della Val di Chiana, venne studiata dal Pasquini. Ivi ad onta del paludismo e anofelismo superstite un po' dapertutto, e specialmente attorno ai laghi di Chiusi e di Montepulciano, pure la regione intiera, dopo il 1880, erasi risanata. Di questo fatto straordinariamente benefico non ogni merito spetta però alla bonifica idraulica, ancora incompiuta.

Alcune bonifiche speciali, *mediante approfondamento e banchinamento di stagni e loro conversione in laghi* (Averno, Lucrino, Fusaro, Mare morto, vicino a Napoli) così come furono ideate da grandi idraulici napoletani, rispondono perfettamente alle nuove teorie sulla malaria: gli specchi d'acqua che rimangono, senz'erba, e soggetti come sono al moto delle onde, non si prestano alla vita acquatica delle zanzare.

Si ebbe quindi un risanamento di luoghi tristamente celebri per la malaria; questa ora è assai lieve, ma non scomparsa, perchè forse mancano o difettano le bonifiche piccole, e perchè la manutenzione di quelle grandi lascia talora a desiderare.

In conclusione ogni sistema di bonifica idraulica ha in sè la potenza di riuscire atto a impedire la vita delle zanzare alla superficie della terra. Ma la mancanza di piccole bonifiche complementari, la cattiva manutenzione dei canali delle grandi bonifiche possono compromettere le migliori opere idrauliche. E perciò con molto senno, con una direi quasi divinazione, il regolamento borbonico del 19 dicembre 1817

per le bonifiche (1), raccomandava il continuo diserbamento dei canali di bonifica.

Per fortuna, anche quando la bonifica idraulica non riesce ad estirpare intieramente l'anofelismo, è il primo passo pel risanamento igienico di un territorio.

Il secondo passo vien fatto per mezzo delle

F) Bonifiche agrarie.

La bonifica idraulica migliore in mezzo a un latifondo, o ad una compagna mal coltivata, riesce inefficace opera di risanamento.

Invece dove fu rotto il latifondo e la bonifica idraulica venne completata con la bonifica agraria, ivi la malaria finisce col diventare più mite. Prima avveniva che quando, compiuti giganteschi lavori idraulici, si iniziava la coltivazione, le colonie agricole soffrivano sempre molto, e certe volte erano anche distrutte a causa della malaria non doma ancora.

Oggi, con la profilassi chininica e meccanica, possiamo allontanare anche questo pericolo; e quindi si dovrebbe imporre l'obbligo della bonifica agricola dopo quella idraulica; altrimenti grandi e costose bonifiche andranno perdute senza vantaggio nè agricolo, nè igienico.

Il nuovo disegno di legge sul bonificamento agrario dell'Agro romano è un primo e timido passo per questa via che deve condurre a rompere o spezzare il latifondo che fu ed è la rovina di tanta e così bella parte d'Italia.

G) Legislazione sanitaria speciale contro la malaria.

Ne demmo noi il primo esempio; è noto cioè che per nostra iniziativa il Parlamento ha già fatte due leggi: con la prima (23 dicembre 1900) chinino puro ed a buon prezzo si venderà mediante esercizio di Stato in ogni angolo del nostro paese, da farmacisti e rivenditori di generi delle privative. Con la seconda (2 novembre 1901) il chinino dovrà esser dato gratuitamente ed abbondantemente dai medici condotti, come curativo o preventivo, a tutti gli operai e contadini dei luoghi di malaria per conto e a spese dei loro padroni.

---

(1) V. *Raccolta di Leggi, Decreti e Regolamenti sulle opere di bonificamento dei terreni paludosi.* Napoli, 1878.

Ed ora, vinti finalmente gli ostacoli che pochi ma rumorosi interessati hanno opposto, delimitate già le zone di malaria in molti comuni del Regno, le due benefiche leggi nella prossima stagione delle febbri incominceranno a rendere quei benefizi inestimabili che le popolazioni aspettano.

Il chinino viene preparato direttamente dallo Stato per mezzo della farmacia militare di Torino, e quindi con tutte le garenzie e col minimo costo. E i proventi che dalla vendita in grande (si calcola in ragione di 30,000 Kg. all'anno) e sia pure a basso prezzo, verranno all'erario, andranno tutti a profitto della lotta nazionale contro la nostra secolare nemica, la febbre.

A preparare intanto i costumi del popolo, senza i quali non possono esser mai efficaci le leggi, in ispecie quelle sanitarie, vennero diffuse fra i contadini 4000 copie di un opuscolo che spiega e fa conoscere la nostra legislazione antimalarica ai più interessati a saperla, per la tutela della loro salute.

Ovunque però occorre un'attiva propaganda di fatti, perchè solo con l'opera concorde dello Stato, delle Amministrazioni pubbliche e di tutti i cittadini, sarà possibile sterminare o almeno indebolire un nemico poderosamente fortificato da secoli ne' suoi estesi dominii.

Certo il problema di liberare dalla malaria un vasto territorio, e, peggio, tutto il nostro paese, con 63 su 69 provincie più o meno infette, è molto più arduo che a qualche semplicista non sembra. Ripeto ancora una volta che, per lungo tempo, e a forze riunite, occorre: *Unum facere et alterum non omittere* di tutti i mezzi profilattici sopra esposti.

Istituto d'igiene della R. Università di Cagliari

Origine e distribuzione dei germi patogeni

nelle acque del porto di Cagliari

Ricerche di **V. E. MALATO CALVINO**, medico provinciale

(con la tavola VI).

I.

L'ufficio sanitario della prefettura di Cagliari, per conoscere le condizioni di salubrità delle spiaggie e delle acque destinate all'ubicazione di stabilimenti balneari marini, chiedeva nella primavera del 1896 a tutti i medici esercenti nei comuni litoranei della provincia, se negli anni precedenti si fossero manifestate infezioni, la causa etiologica delle quali si potesse presumere legata a quelle condizioni.

Richiamava inoltre l'attenzione degli ufficiali sanitari degli stessi comuni sulla necessità di provvedere di latrine e bottini mobili gli stabilimenti anzidetti, ritenendo l'abbandono delle deiezioni nelle acque una minaccia alla salute dei bagnanti.

Non si ebbero concludenti risposte, non essendo stati mai raccolti gli occorrenti dati statistici.

Mancato pertanto il criterio fondamentale della morbosità, nè avendosene altri di qualche importanza a poter dare un giudizio positivo, nè potendosi ledere interessi privati con proibizioni e provvedimenti che avrebbero avuto carattere quasi arbitrario, perchè dettati da preconcetti di valore molto discutibile, gli stabilimenti

nel 1896 ed anni successivi lasciaronsi costruire nelle solite ubicazioni.

Nell'estate del 1899 corse però voce insistente che alcuni processi febbrili di natura indefinita, manifestatisi a Cagliari, potessero avere origine da infezioni contratte con le acque dei bagni di mare.

Di fronte a questi allarmi, il prefetto della provincia, a formarsi un concetto del loro valore, e provvedere, si rivolse per notizie ai medici della città, e li invitò ad una riunione per discutere sull'argomento.

In questa tutti i sanitari presenti, fondandosi sull'esperienza personale avuta nell'esercizio clinico privato, dichiararono che quei processi, ritenuti da alcuni infezioni malariche, da altri infezioni intestinali, eransi verificati in generale in individui che non avevano usato di bagni marini. Si concluse quindi da tutti i presenti che tali infezioni, anco perchè verificatesi negli anni precedenti e in tutte le stagioni, sebbene più d'estate, non erano in rapporto speciale all'uso dei bagni di mare, ma che tuttavia sarebbe stato opportuno studiare se nelle acque di questi fosse qualche pericoloso inquinamento.

II.

In una pregevole pubblicazione (1) il Cascella, dopo avere esposti i risultati di sue esperienze sulle acque del lido di Napoli in rapporto alle mutate condizioni delle fogne, esperienze condotte comparativamente ad altre analoghe del Sanfelice (2) e del Marcantonio e dopo avere passati in rapida rassegna i lavori del Canalis e dell'ingegnere Bianchi (3) sulle acque del porto di Genova, dell'Alessi su quelle d'una sezione (Cala) del porto di Palermo (4), del Fossangrives (5) prima, e poi del Brouardel e del Proust (6) su quelle del porto di Marsiglia, del Fischer su quelle del porto di Kiel (7), accenna alle seguenti modalità per le quali le acque inquinate di mare

(1) Rivista d'Igiene e di Medicina Pratica « L'Ufficiale Sanitario », numeri 9-10, 1899.
(2) Bollettino della Società di Naturalisti in Napoli, anno 3°, fascicolo I, 1899.
(3) Annali di medicina navale, agosto 1897, pag. 1108.
(4) Bollettino della Soc. d'Igiene di Palermo, vol. III, 1896.
(5) *Hygiène et assainissement des villes.*
(6) Annales d'Hygiène, etc., s. 3, t. 14.
(7) *Die Bacterien des Meeres nach den Untersuchungen der Plankton-Expedition.* Kiel und Leipzig. Verlag von Lipsius und Fischer, 1894.

possono procurare morbi infettivi all'uomo: 1° ingestione delle acque anzidette; 2° inquinamento del sottosuolo per germi in questo pervenuti prima che siano stati distrutti dal potere battericida delle acque stesse. e che dal sottosuolo, se vi trovano condizioni di vita, possono aggredire l'uomo o a mezzo dell'aria o a mezzo dell'acqua sotterranea attinta per uso domestico (Cascella); 3° emanazioni di gas, in quanto fiaccano fisicamente e intellettualmente l'uomo e lo predispongono a contrarre malattie infettive (Renk) (1), in ispecie il tifo (Alessi); 4° germi infettivi che, lasciati dalle acque marine alla superficie delle spiaggie, possono da queste, attraverso l'aria o per altra via, raggiungere l'uomo; 5° esseri viventi marini contenenti germi infettivi delle acque, germi che possono passare all'uomo che si cibi di quegli esseri crudi o non ben cotti (Britsh-Fischer); 6° azione diretta dei germi infettivi sulla cute bagnata dalle acque che li contengono (Cassedebat).

Dal Cascella e dagli autori suaccennati, il grado d'inquinamento delle acque di porti e spiaggie ed i pericoli a questo inerenti, sono stati valutati in ragione del numero dei germi in quelle contenuto e, a determinare i germi patogeni inquinanti, si sono tentate, ma per lo più invano, o senza concreti risultati, inoculazioni negli animali.

Con le ricerche qui appresso descritte, s'è avuto invece lo scopo, non tanto di determinare il grado d'inquinamento, quanto specialmente la qualità dei germi patogeni inquinanti le acque del porto e del lido di Cagliari, la loro origine e la loro distribuzione nelle varie sezioni del porto e nelle acque delle circostanti spiaggie.

III.

Gli esperimenti furono dapprima condotti nel modo seguente:

In una Erlenmeyer, si prelevava in un punto prestabilito un campione d'acqua di mare, del quale poco dopo s'inoculava un centimetro cubo in vena ad una cavia o ad un coniglio, mentre un centimetro cubo o frazione di questo si utilizzava per piastre in agar destinate alla numerazione dei batteri.

Per poter ripetere in alcuni casi e ad intervalli inoculazioni e piastre, si conservava il campione fuori dell'azione della luce.

Nella tabella I sono riassunti i 17 esperimenti eseguiti con questo

(1) Congresso di Vienna 1899.

metodo, che si abbandonò perchè riconosciuto fallace. Infatti, trattandosi di campioni prelevati dentro il porto, e per lo più in prossimità di sbocchi di fogne e fra numerose navi, i frequenti risultati negativi delle inoculazioni dovevano razionalmente supporsi in rapporto, non all'assenza di patogeni nell'acqua inoculata, ma al loro scarso numero, tante volte insufficiente a superare quella prima resistenza delle cellule degli organismi inoculati, la quale rappresenta l'ultimo, ma il più valido ostacolo all'attecchimento dei germi infettivi.

Queste considerazioni spiegherebbero perchè le inoculazioni di acque marine profondamente inquinate abbiano dato ad altri sperimentatori, tanto più se sottocutanee, risultati negativi.

Ad evitare l'inconveniente, occorreva dunque, o inoculare una quantità rilevante delle acque sospette, che sarebbe stata per sè stessa mortale per l'animale da esperimento, o inoculare il residuo della filtrazione di alcuni litri di acque.

Quest'ultimo espediente fu tentato più volte, ma, come prevedevasi, senza risultato, poichè nel tempo che s'impiegava per la filtrazione (apparecchio Chamberland), i germi si attenuavano (1); e che ciò dovesse avvenire, s'era previsto nel corso dei succennati 17 esperimenti nei quali, quante volte furono eseguite con uno stesso campione inoculazioni ad intervalli, e dopo una prima inoculazione positiva o negativa, si ebbe sempre risultato negativo.

Allora si procedette nelle consecutive esperienze col seguente metodo:

Sulla superficie d'agar, previamente solidificata al fondo d'una scatola di Petri, si versava un cmc. d'acqua, aspirato con una pipetta sterile dagli strati superficiali del mare in un determinato punto, si ricopriva cautamente la scatola, si riportava subito in laboratorio, e, dopo aver procurato con adatti movimenti che l'acqua avesse toccati tutti i punti della superficie colturale, si chiudeva per poco in un recipiente contenente sostanze igroscopiche, per conseguire una conveniente evaporazione dell'acqua dalla detta superficie, poscia si lasciava la scatola in completo riposo all'ambiente.

In questo la temperatura media nel corso degli esperimenti, eseguiti dal maggio all'agosto del 1900, si mantenne in media fra i 18° e 25° C. circa.

(1) Dott. Giuseppe Pinna. *Sul potere attenuante dell'acqua di mare.* Riforma Medica, n. 110, luglio 1894.

Dopo 24-18 ore, od al più tardi, eccezionalmente, al terzo giorno si emulsionavano in pochi cmc. d'acqua sterile le colonie sviluppatesi sulla superficie colturale, e s'inoculava in giugulare ad una cavia, o ad un coniglio un cmc. del materiale ottenuto.

Morto un animale, se ne eseguiva l'autopsia, se ne esaminava al microscopio il sangue della milza e del cuore, si trasportavano 8-10 anse di sangue di quest'organo su punti diversi della superficie inclinata dell'agar d'un tubo da coltura, ed in seguito si osservavano al microscopio i batteri che si fossero sviluppati.

Talvolta s'inoculava in giugulare ad un secondo animale un'emulsione di questa coltura.

Questo metodo si adottò senza varianti su 50 campioni (tabella II), prelevati o nel porto a distanze varie dagli sbocchi di fogne, o presso le spiaggie libere, o nel perimetro e nelle prossimità dei due principali stabilimenti di bagni marini, o a distanza varia dal principale sbocco a mare dello stagno di Cagliari, sia nell'interno dello stagno che a mare, sempre però nel corso della corrente fra questo e quello.

Sulle superficie colturali delle scatole di Petri svilupparonsi, fra gli altri, spesso batteri fosforescenti, e, quasi costantemente, tifo-simili e similcoli fra i quali tutti quelli rivelati patogeni per gli animali d'esperimento.

Dai campioni prelevati da specchi d'acqua, presupposti non inquinati perchè lontani molto da qualsiasi apprezzabile sorgente d'inquinamento, si ebbe scarsissimo numero di colonie di batteri accidentali.

Per questo metodo di ricerca si poteva rilevare con l'inoculazione endovenosa anco un sol germe patogeno che si fosse sviluppato dal cmc. d'acqua utilizzata per l'esperimento.

A questa pubblicazione è unito il disegno del profilo del porto di Cagliari e delle spiaggie circostanti per mostrare i punti nei quali furono prelevati i campioni segnati nella I e II tabella.

Da ciascuno dei 50 ultimi campioni s'isolarono, mediante l'inoculazione endovenosa, in uno due germi, in 25 uno solo, ed in 24 nessuno.

Le colture pure dei germi patogeni isolati dettero, nei pochi casi in cui vennero inoculate, risultato positivo, eccetto che una; ma spesso con qualche ritardo, forse per l'attenuazione che subivano nei mezzi colturali.

Dai campioni prelevati nel porto, sia a grandi che a brevi distanze dallo sbocco di fogne, non si ebbero costantemente risultati

positivi se il prelevamento non era stato da poco tempo preceduto da pioggie abbondanti; costantemente positivi invece, eccetto per uno, se prelevati poco dopo le pioggie. L'incostanza del risultato positivo nel primo caso era dipendente da un meno grave, non uniforme, sebbene normale e costante, inquinamento delle acque marine, dovuto principalmente ai rifuti delle navi ancorate nelle varie sezioni del porto; mentre la costanza del risultato positivo nel secondo caso era anco dipendente da un inquinamento occasionale, rilevante e più uniforme, dovuto alle acque ed ai materiali immondi delle fogne urbane le quali, perchè pessimamente costruite, poco o nulla portavano al mare senza l'intervento di abbondanti acque piovane; consta infatti che il loro fondo assorbente cedeva interamente, o in massima parte al sottosuolo urbano i liquidi immondi e le acque di rifiuto che normalmente vi giungevano dall'abitato.

Soltanto una fogna della città, che ha sbocco fuori del porto, dava forse costantemente contributo, per quanto scarso, al mare. Era tale contributo l'unico fattore apprezzabile d'inquinamento dello specchio d'acqua, nel quale ha foce la fogna, e tale inquinamento fu, dopo abbondanti pioggie, constatato al largo sino a m. 300 di distanza della stessa foce (tabella II, n. 18).

L'inquinamento *normale* del porto non si estendeva agli stabilimenti balneari marini della città. Infatti, dai campioni prelevati nel tratto di mare interposto tra il porto e gli stabilimenti stessi, si ebbe risultato positivo solamente quando il prelevamento fu preceduto da pioggie abbondanti, come per la circostanza stessa si ebbe in generale esito positivo anco dai campioni prelevati nel perimetro degli stabilimenti balneari non ancora frequentati da bagnanti.

Dai campioni prelevati in questo si ebbero risultati negativi quante volte mancarono e le pioggie e i bagnanti, e positivi quando intervenne anco un solo di questi fattori d'inquinamento; ma per la sola frequenza dei bagnanti questo non s'estendeva molto al di là del perimetro anzidetto, tanto che dai campioni prelevati a circa m. 100 da esso si ebbero risultati negativi, quando da quelli prelevati contemporaneamente a più breve distanza si ebbero risultati positivi (tabella II, numeri 32, 33, 34, 35).

Dai campioni prelevati alla bocca principale dello stagno, o presso, si ebbe con frequenza risultato positivo; ma, se la corrente era diretta dallo stagno al mare con sensibile velocità, si aveva risultato negativo da quelli prelevati dentro lo stagno, e positivo da quelli prelevati alla bocca di esso, o al mare.

Da queste circostanze si deduce che la causa d'inquinamento non era nello stagno, ed infatti la causa unica apprezzabile era rappresentata dai rifiuti di barche da pesca e di pescatori che ordinariamente si trovano in discreto numero in prossimità della bocca anzidetta.

Dai campioni prelevati, anche poche ore dopo abbondanti pioggie, in prossimità di spiagge libere e disabitate, si ebbero risultati negativi.

I fatti e le considerazioni suesposte portano alle seguenti *conclusioni:*

Nel porto di Cagliari si aveva all'epoca degli esperimenti un inquinamento normale e costante, dato principalmente dalle navi che vi si trovavano ancorate, ed uno occasionale, di durata varia, dato dal discarico delle fogne urbane in coincidenza con le pioggie.

Dei due inquinamenti questo si estendeva talvolta sino agli stabilimenti dei bagni marini della città.

Un inquinamento si verificava costantemente in questi quando erano frequentati da bagnanti.

Le acque dello stagno non giungevano inquinate alla bocca principale di esso; ma presso questo subivano un inquinamento che non poteva probabilmente raggiungere neanco il più vicino stabilimento balneare, non tanto per l'esigua portata dell'inquinamento stesso, quanto perchè questo o si disperdeva al largo se la corrente era diretta al mare, o allo stagno se si aveva corrente inversa, o si arrestava presso la bocca se la corrente era nulla.

L'inquinamento da germi patogeni nelle acque degli stabilimenti balneari marini, sia dato direttamente dai bagnanti, sia proveniente dal porto, era sempre rappresentato da germi d'origine esclusivamente intestinale, e non v'ha dubbio ch'essi potessero dare infezioni; ma se ciò sia avvenuto ed in qual misura non poteva essere stabilito da studi sperimentali, ma, com'era stato previsto, dall'osservazione e dalla statistica clinica.

TABELLA I.

Riassunto degli esperimenti

Numero d'ordine dei campioni	Data dei prelevamenti	Condizioni meteorologiche verificatesi 2-24 ore prima di ciascun prelevamento					Condizioni speciali nell'att
		data in cui verificaronsi	vento dominante: direzione	vento dominante: velocità oraria in Km.	millimetri di pioggia nelle 24 ore	temperatura media nelle 24 ore	punto nel quale si prelevò ciascun campione
1°	9-2-900	8-2-900	W. N. W.	18	15.2	c. 11.1	nel porto, allo sbocco di una fogna
		9-2-900	N. N. W.	32	7.5	c. 10.5	
2°	»	»	»	»	»	»	nel porto, a breve distanza dallo sbocco di una fogna
3°	11-2-900	10-2-900	W. N. W.	36	1.1	c. 8.7	»
		11-2-900	W.	13	1.7	c. 11.4	
4°	»	»	»	»	»	»	»
5°	»	»	»	»	»	»	nel porto, a m. 150 da sbocchi di fogne
6°	»	»	»	»	»	»	nel porto, a m. 280 da sbocchi di fogne
7°	21-2-900	20-2-900	W. N. W.	43	0	12.8	nel porto allo sbocco di una fogna.
		21-2-900	N. N. W.	61	1.0	11.2	
8°	»	»	»	»	»	»	nel porto, a m. 130 da sbocchi di fogne
9°	»	»	»	»	»	»	nel porto, a m. 220 da sbocchi di fogne
10°	23-2-900	22-2-900	»	35	0	11.4	all'esterno del braccio di levante del porto, allo sbocco di una fogna
		23-2-900	»	23	»	12.0	

e dei loro risultati.

di ciascun prelevamento	Notizie relative agli esperimenti			
condizioni dello specchio d'acqua, circostante al punto di prelevamento, e del mare	numero di colonie sulle piastre	date: delle inoculazioni	date: degli esiti delle inoculazioni	esiti delle inoculazioni
presenza di navi, mare calmo	grandissimo	16-2-900	22-2-900	morte in 7ª giornata — isolato un germe patogeno dal sangue.
»	»	24-2-900	—	l'animale inoculato sopravvive oltre 1 mese.
»	450	—	—	non eseguite inoculazioni in animali.
»	150	—	—	»
presenza di navi, ma a qualche distanza dal punto di prelevamento.	660	23-2-900	20-2-900	morte in 25ª giornata — emaciazione somma e nessun germe nel sangue.
»	90	—	—	non eseguite inoculazioni in animali.
presenza di navi, mare calmo	grandissimo	21-2-900	24-2-900	morte in 3ª giornata — isolato un germe patogeno dal sangue.
assenza di navi, mare calmo	370	»	11-3-900	morte in 20ª giornata — emaciazione somma — nessun germe nel sangue.
»	180	—	—	non eseguite inoculazioni in animali.
presenza di navi, mare calmo	grandissimo	23-2-900	16-3-900	morte in 21ª giornata — isolato un germe dal sangue.

Segue Tabella I.

Riassunto degli esperimenti

Numero d'ordine dei campioni	Data dei prelevamenti	Condizioni meteorologiche verificatesi 2-24 ore prima di ciascun prelevamento						Condizioni speciali nell'att
		data in cui verificaronsi	vento dominante		millimetri di pioggia nelle 24 ore	temperatura media nelle 24 ore		punto nel quale si prelevò ciascun campione
			direzione	velocità oraria in Km.				
11°	23-2-900	23-2-900	N. N. W.	23	0	12.0		a m. 120 dalla fogna succennata
12°	26-2-900	25-2-900	S. E.	32	»	13.5		nel porto, allo sbocco di una fogna
		26-2-900	N. W.	29	»	14.5		
13°	27-2-900	»	»	»	»	»		»
		27-2-900	»	»	»	14.3		
14°	»	»	»	»	»	»		»
15°	»	»	»	»	»	»		nel porto, a m. 50 dallo sbocco di una fogna
16°	3-3-900	2-3-900	N. N. W.	30	»	11.5		nel porto, allo sbocco di una fogna
		3-3-900	»	»	»	7.9		
17°	22-3-900	22-3-900	W. S. W.	24	4.3	11.4		all'esterno del braccio di levante del porto, allo sbocco di una fogna.
		23-3-900	W.	51	0.3	11.5		

e dei loro risultati.

di ciascun prelevamento	Notizie relative agli esperimenti			
condizioni dello specchio d'acqua, circostante al punto di prelevamento, e del mare	numero di colonie sulle piastre	date		esiti delle inoculazioni
		delle inoculazioni	degli esiti delle inoculazioni	
presenza di navi, mare calmo	32	23-2-900	15-3-900	morte in 20ª giornata — estrema emaciazione — nessun germe nel sangue
»	grandissimo	26-2-900	8-3-900	morte in 10ª giornata — isolato un germe dal sangue.
»	»	27-2-900	2-3-900	morte in 3ª giornata — isolato un germe dal sangue.
»	»	»	12-3-900	morte in 14ª giornata - isolato un germe dal sangue.
»	»	»	15-3-900	morte in 17ª giornata — isolato un germe dal sangue.
»	»	4-3-900	7-3-900	morte in 4ª giornata — nessun germe nel sangue.
assenza di navi, mare calmo	»	24-3-900	26-3-900	morte in 3ª giornata — nessun germe nel sangue.

TABELLA II.

Riassunto degli esperimenti

Numero d'ordine dei campioni	Data dei prelevamenti	Condizioni meteorologiche verificatesi 2-24 ore prima di ciascun prelevamento					Condizioni speciali nell'atto
		data in cui verificaronsi	vento dominante		millimetri di pioggia nelle 24 ore	temperatura media nelle 24 ore	punto nel quale si prelevò ciascun campione
			direzione	velocità oraria in Km.			
1°	10-5-900	9-5-900 10-5-900	W. W. N. W.	59 46	0. 4 2. 2	15. 15 14. 9	nel porto, a m. 280 da sbocchi di fogne
2°	»	»	»	»	»	»	nel porto, a qualche distanza da sbocchi di fogne
3°	»	»	»	»	»	»	fuori del porto all'esterno del nuovo braccio di molo di ponente
4°	»	»	»	»	»	»	nel perimetro dello stabilimento balneare Devoto
5°	11-5-900	10-5-900 11-5-900	» W.	46 25	2. 2 —	14.9 14. 8	»
6°	»	»	»	»	2. 2	»	presso lo stabilimento balneare Devoto
7°	»	»	»	»	»	»	presso la spiaggia, e in un punto intermedio fra il detto stabilim. e la bocca della Scafa
8°	»	»	»	»	»	»	alla bocca della Scafa
9°	27-6-900	26-6-900 27-6-900	N. S. S. W.	40 36	— —	24. 4 23. 2	nel perimetro dello stabilim. balneare Devoto
10°	»	»	»	»	2. 2	»	presso lo stabilimento anzidetto

dei loro risultati.

ciascun prelevamento	Notizie relative agli esperimenti			
condizioni dello specchio d'acqua, circostante al punto di prelevamento, e del mare	numero di colonie sulle piastre	date: delle inoculazioni	date: degli esiti delle inoculazioni	esiti delle inoculazioni
presenza di navi — mare mosso lievemente — acqua alquanto torbida	320	11-5-900	12-5-900	morte in 16 ore, isolato un germe.
presenza di navi — mare appena mosso — acqua un po' torbida	690	»	»	morte in 16 ore, isolato un germe.
assenza di navi — mare superficialmente mosso — acqua limpida	23	»	14-5-900	morte in 4ª giornata per estesa coccidiosi — nessun germe nel sangue.
assenza di navi e di bagnanti — mare superficialmente mosso — acqua alquaeto limpida	47	»	15-5-900	morte in 5ª giornata per estesa coccidiosi — nessun germe nel sangue.
»	82	12-5-900	21-6-900	morte dopo oltre un mese — nessun germe nel sangue.
»	51	»	16-6-900	»
»	27	»	»	»
presenza di barchette da pesca — mare superficialmente mosso — corrente insensibile dallo stagno a mare	87	»	25-6-900	»
assenza di navi e di bagnanti — mare calmo — acqua limpida	36	28-6-900	3-7-900	morte in 6ª giornata per avanzata coccidiosi — nessun germe nel sangue.
»	22	»	20-7-900	morte in 23ª giornata — nessun germe nel sangue.

Segue TABELLA II.

Riassunto degli esperimenti

Numero d'ordine dei campioni	Data dei prelevamenti	Condizioni meteorologiche verificatesi 2-24 ore prima di ciascun prelevamento					Condizioni speciali nell'atto
		data in cui verificaronsi	vento dominante		millimetri di pioggia nelle 24 ore	temperatura media nelle 24 ore	punto nel quale si prelevò ciascun campione
			direzione	velocità oraria in Km.			
11°	29-6-900	28-6-900 29-6-900	N. N. N. W.	27 59	3. 5 0. 4	23. 1 20. 6	nel porto, a m. 150 da sbocchi di fogne
12°	»	»	»	»	»	»	presso lo stabilimento balneare Devoto
13°	»	»	»	»	»	»	dentro lo stagno a m. 30 dalla bocca interna della Scafa
14°	5-7-900	4-7-900 5-7-900	N. W. N. E.	40 6	5. 4 0. 9	21. 4 17. 8	nel porto, a m. 100 da sbocchi di fogne
15°	»	»	»	»	»	»	in una sezione del porto, nella quale non sboccano fogne
16°	»	»	»	»	»	»	in altra sezione del porto, nella quale non sboccano fogne
17°	»	»	»	»	»	»	fuori del porto, presso l'estremo del braccio di molo di levante
18°	»	»	»	»	»	»	all'esterno del braccio di molo di levante a metri 300 dallo sbocco di una fogna
19°	»	»	»	»	»	»	fuori del porto alla foce del canale delle saline
20°	»	»	»	»	»	»	presso la spiaggia libera di levante

dei loro risultati.

ciascun prelevamento	Notizie relative agli esperimenti			
condizioni dello specchio d'acqua, circostante al punto di prelevamento, e del mare	numero di colonie sulle piastre	date: delle inoculazioni	date: degli esiti delle inoculazioni	esiti delle inoculazioni
presenza di navi, ma a qualche distanza dal punto di prelevamento — mare calmo — acqua appena torbida	83	30-6-900	3-8-900	morte dopo oltre un mese — nessun germe nel sangue — avanzata emaciazione.
presenza di pescatori immersi in acqua e di barche da pesca — mare calmo — acqua quasi limpida	43	»	20-7-900	morte in 21ª giornata — isolato un germe dal sangue.
presenza di barchette da pesca — corrente nulla — acqua leggermente torbida	112	»	2-7-900	morte in 3ª giornata — isolato un germe dal sangue.
presenza di navi — mare calmo — acque torbide	230	8-7-900	9-7-900	morte in 16 ore — isolato un germe dal sangue.
presenza di navi — mare calmo — acqua un po' torbida	43	»	18-7-900	morte in 11ª giornata — isolato un germe dal sangue.
presenza di navi — mare calmo — acqua quasi limpida	15	»	10-7-900	morte in meno di 40 ore — isolato un germe dal sangue.
assenza di navi — mare calmo — acqua limpida	30	»	21-7-900	morte in 24ª giornata — nessun germe nel sangue.
assenza di navi — mare calmo — acqua limpida	19	»	11-7-900	morte in 4ª giornata — isolato un germe dal sangue.
assenza di navi — mare calmo — acqua limpida — bassissimo fondo con ricca vegetazione	56	»	26-7-900	morte in 10ª giornata — nessun germe nel sangue.
»	22	»	11-8-900	morte dopo oltre un mese — nessun germe nel sangue.

Segue TABELLA II.

Riassunto degli esperimenti

Numero d'ordine dei campioni	Data dei prelevamenti	Condizioni meteorologiche verificatesi 2-24 ore prima di ciascun prelevamento					Condizioni speciali nell'atto
		data in cui verificaronsi	vento dominante		millimetri di pioggia nelle 24 ore	temperatura media nelle 24 ore	punto nel quale si prelevò ciascun campione
			direzione	velocità oraria in Km.			
21°	5-7-900	5-7-900	N. E.	6	0.9	17.8	presso la spiaggia libera di levante
22°	13-7-900	12-7-900	S. E.	23	0.4	24.4	nel porto, verso la sua entrata
		13-7-900	N. N. W.	22	2.9	22.5	
23°	»	»	»	»	»	»	nel porto, verso la sua entrata, e quasi nel mezzo di esso
24°	»	»	»	»	»	»	presso lo stabilimento balneare Carboni
52°	»	»	»	»	»	»	presso lo stabilimento balneare Devoto
26°	»	»	»	»	»	»	nello stagno a m. 60 dalla bocca interna della Scafa
27°	»	»	»	»	»	»	fuori lo stagno, alla bocca esterna della Scafa
28°	»	»	»	»	»	»	fuori lo stagno, a m. 150 dalla bocca esterna della Scafa
29°	9-8-900	8-8-900	S. E.	20	—	26.2	in una sezione del porto priva di fogne
		9-8-900	N. W.	41	—	24.4	
30°	»	»	»	»	2.9	»	in altra sezione del porto, a m. 200 da sbocchi di fogne
31°	»	»	»	»	»	»	in altra sezione del porto, a m. 350 da sbocchi di fogne

e dei loro risultati.

di ciascun prelevamento	Notizie relative agli esperimenti			
condizioni dello specchio d'acqua, circostante al punto di prelevamento, e del mare	numero di colonie sulle piastre	date		esiti delle inoculazioni
		delle inoculazioni	degli esiti delle inoculazioni	
assenza di navi — mare calmo — acqua limpida — bassissimo fondo con ricca vegetazione.	9	»	18–7–900	morte in 11ª giornata — nessun germe nel sangue.
presenza di navi a qualche distanza — mare calmo acqua limpida	21	16–7–900	19–7–900	morte in 4ª giornata per avanzata coccidiosi — nessun germe nel sangue.
presenza di navi presso il punto di prelevamento — mare calmo — acqua limpida	34	»	30–7–900	morte in 15ª giornata — nessun germe nel sangue.
qualche barca da pesca a distanza — nessun bagnante — mare calmo — acqua torbida	15	»	27–7–900	morte in 12ª giornata — nessun germe nel sangue.
»	38	»	12–8–900	morte in 28ª giornata — nessun germe nel sangue.
presenza di barche da pesca — onde larghe, lente — acqua un pò torbida corrente nulla	27	»	17–7–900	morte in 2ª giornata — isolato un germe dal sangue.
»	68	»	29–7–900	morte in 14ª giornata — isolato un germe dal sangue.
»	20	»	17–8–900	morte in 33ª giornata — nessun germe nel sangue.
presenza di molte navi — onde ampie, lentissime — acqua limpida alquanto	570	11–8–900	12–8–900	morte in 2ª giornata — isolato un germe dal sangue.
presenza di navi — onde ampie, lentissime — acqua limpida	123	»	26–8–900	morte in 16ª giornata — nessun germe nel sangue.
»	39	»	14–8–900	morte in 4ª giornata — avanzata coccidiosi — nessun germe nel sangue.

Segue TABELLA II.

Riassunto degli esperimenti

Numero d'ordine dei campioni	Data dei prelevamenti	Condizioni meteorologiche verificatesi 2-24 ore prima di ciascun prelevamento					Condizioni speciali nell'atto
		data in cui verificaronsi	vento dominante		millimetri di pioggia nelle 24 ore	temperatura media nelle 24 ore	punto nel quale si prelevò ciascun campione
			direzione	velocità oraria in Km.			
32°	9-8-900	9-8-900	N. W.	41	2.9	24.4	a m. 100 e di fronte allo stabilimento balneare Carboni
33°	»	»	»	»	»	»	presso molto allo stabilimento balneare Carboni
34°	»	»	»	»	»	»	a m. 100 dallo stabilimento balneare Devoto, e ad est di esso
35°	»	»	»	»	»	»	nel perimetro dello stabilimento balneare Devoto
36°	»	»	»	»	»	»	dentro lo stagno, a m. 130 dalla bocca interna della Scafa
37°	»	»	»	»	»	»	fuori dello stagno, a m. 50 dalla bocca esterna della Scafa
38°	»	»	»	»	»	»	fuori dello stagno, a metri 400 dalla bocca esterna della Scafa
39°	18-8-900	17-7-900 18-8-900	E. S. S. E.	16 12	16.7 6.0	23.0 21.5	in una sezione del porto, a m. 40 da sbocchi di fogne
40°	»	»	»	»	»	»	in altra sezione del porto, a m. 70 da sbocchi di fogne
41°	»	»	»	»	»	»	in altra sezione del porto, priva di fogne

e dei loro risultati,

di ciascun prelevamento	Notizie relative agli esperimenti			
condizioni dello specchio d'acqua, circostante al punto di prelevamento, e del mare	numero di colonie sulle piastre	date		esiti delle inoculazioni
		delle inoculazioni	degli esiti delle inoculazioni	
assenza di navi — presenza di barche da pesca e di qualche bagnante — acqua limpida	22	11-8-900	20-8-900	morte in 9ª giornata — nessun germe nel sangue.
id. ma presenza di molti bagnanti — acqua leggermente torbida	216	»	14-8-900	morte in 4ª giornata — isolato un germe dal sangue.
presenza di bagnanti a distanza — acqua appena torbida	129	»	20-8-900	morte in 9ª giornata — nessun germe nel sangue.
presenza di numerosi bagnanti — acqua alquanto torbida	738	»	16-9-900	morte in 14 ore — isolato un germe dal sangue.
assenza di barche — stagno calmo — acqua appena torbida — corrente dallo stagno al mare	27	»	»	morte in 37ª giornata — nessun germe nel sangue.
presenza di barche da pesca — acqua quasi limpida — corrente sensibile dallo stagno al mare	51	»	12-8-900	morte in 14 ore — isolato un germe dal sangue.
specchio d'acqua libero da navi — onde ampie e lente — acqua limpida — corrente sensibile dallo stagno al mare	35	»	»	»
presenza di molte navi — onde ampie, lente — acqua molto torbida	grandissimo	18-8-900	21-8-900	morte in 4ª giornata — isolato un germe dal sangue.
presenza di navi — onde come sopra — acqua un po' torbida	»	»	28-8-900	morte in 11ª giornata — nessun germe nel sangue.
»	grande	»	29-8-900	morte in 12ª giornata — isolato un germe nel sangue.

Segue TABELLA II.

Riassunto degli esperimenti

Numero d' ordine dei campioni	Data dei prelevamenti	Condizioni meteorologiche verificatesi 2-24 ore prima di ciascun prelevamento					Condizioni speciali nell'atto
		data in cui verificaronsi	vento dominante		millimetri di pioggia nelle 24 ore	temperatura media nelle 24 ore	punto nel quale si prelevò ciascun campione
			direzione	velocità oraria in Km.			
42°	18-8-900	18-8-900	S. S. E.	12	6.0	21.5	in altra sezione del porto, priva di fogne
43°	»	»	»	»	»	»	presso la bocca del porto, a m. 460 da sbocchi di fogne
44°	»	»	»	»	»	»	all'estremità del braccio di molo di ponente
45°	»	»	»	»	»	»	in un punto intermedio fra detta estremità e bagni Carboni
46°	»	»	»	»	»	»	molto presso allo stabilimento balneare Carboni
47°	»	»	»	»	»	»	presso lo stabilimento balneare Devoto
48°	»	»	»	»	»	»	dentro lo stagno, a m. 70 dalla bocca interna della Scafa
49°	23-8-900	22-8-900	S. E.	17	—	24.4	nel perimetro dello stabilimento balneare Devoto
		23-8-900	»	18	—	24.7	
50°	»	»	»	»	6.0	»	»

e dei loro risultati.

di ciascun prelevamento	Notizie relative agli esperimenti			
condizioni dello specchio d'acqua, circostante al punto di prelevamento, e del mare	numero di colonie sulle piastre	date		esiti delle inoculazioni
		delle inoculazioni	degli esiti delle inoculazioni	
presenza di navi — onde ampie, lente — acqua un po' torbida	113	18-9-900	19-8-900	morte in 14 ore — isolati due germi dal sangue.
qualche nave alquanto distante — onde come sopra — acqua appena torbida	28	»	»	morte in 14 ore — isolato un germe dal sangue.
navi a distanza — onde come sopra — acqua alquanto torbida	411	»	»	»
specchio d'acqua libero da navi — onde come sopra — acqua leggermente torbida	115	»	»	morte in 2ª giornata — isolato un germe dal sangue.
assenza di navi e di bagnanti — onde come sopra — acqua leggermente torbida	43	»	14-9-900	morte in 27ª giornata — nessun germe nel sangue.
»	21	»	18-9-900	morte in 32ª giornata — nessun germe nel sangue.
qualche barchetta da pesca — stagno calmo e acqua appena torbida — sensibile corrente dallo stagno al mare	25	»	11-9-900	morte in 24ª giornata — nessun germe nel sangue.
presenza di pochi bagnanti — mare calmo — acqua leggermente torbida	87	24-8-900	25-8-900	morte in 14 ore — isolato un germe dal sangue.
»	116	»	26-8-900	morte in 3ª giornata — isolato un germe dal sangue.

occo di f

XIV

16.0

MALATO CALVINO - Origine e distribuzione dei germi patogeni nelle acque del porto di Cagliari

Sbocco di fogna

15.
20. 41.

16. 42.

XVII
Sbocco di fogna

XI

19. 20. 21.

18.

Istituto d'Igiene della Regia Università di Napoli

Contributo alle cognizioni sull'etiologia della pellagra

PARTE III

per il prof. **V. de GIAXA.**

Delle diverse teorie sull'etiologia della pellagra, nessuna, ad onta delle numerevoli osservazioni e delle relative ricerche sperimentali, ebbe sinora un' inconfutabile conferma; e ne è prova, sopratutto, il fatto che tuttavia si perdura nelle indagini, e mentre da un lato si addita come unico fattore etiologico della malattia un germe infettivo, dall'altro lato si insiste nell'affermare che la pellagra debba ascriversi a sostanze tossiche preformate nel granturco alterato. Sono pochi quelli che accettano, almeno come discutibile, un processo di auto-intossicazione, susseguente ad una alimentazione maidica, nella quale sia continuo, molto preponderante, e persino quasi esclusivo, il consumo di mais, ancorchè sano: specialmente se si compia sotto forma ed in guisa inadatta, per cui ne risulti nell' intestino dell' individuo la produzione di un *veleno specifico*, esito dell'attività biologica di uno degli abituali microrganismi del tratto intestinale.

Eppure, questa teoria dell'auto-intossicazione, come accennai, or sono più anni, nel lavoro (parte seconda) da me pubblicato in questi Annali, collo stesso titolo del presente, è forse quella che, secondo il mio avviso, starebbe, più di ogni altra, in accordo col modo di manifestazione, col decorso, e colle diverse lesioni anatomo-patologiche della pellagra, la quale, abbenchè, nei suoi diversi stadii e

nell'esito, presenti notevoli differenze, deve tuttavia riguardarsi quale morbo ben caratterizzato, e per cui la causa che lo genera, al pari che per le malattie infettive e per quelle dovute a veleni microbici, è da ritenersi come specifica.

Se si assegna alla inadatta alimentazione maidica, ed alle condizioni di vita dell'individuo che può divenire pellagroso, la giusta parte che spetta a tali fattori nella etiologia della pellagra, è fuori dubbio che quella *causa specifica* non sia da ricercarsi che nell'azione di un germe infettivo, od in quella di una sostanza tossica di natura microbica. A me pare, quindi, che, tenendo conto di quanto oggi ci insegnano la batteriologia e la patologia, convenga concedere che la pellagra, la quale complessivamente offre un quadro morboso ben distinto e costante, e per la quale si ammette, ormai generalmente, la natura microbica — od infettiva, o tossica — abbia la sua origine da un microrganismo unico, specifico, indipendentemente dal fatto, se l'organismo colpito dal morbo, lo sia per l'invasione del germe, ovvero per l'azione dei suoi veleni. Questo semplice ragionamento lascia scorgere il lato debole della teoria che ammette, come esclusiva causá della pellagra, le sostanze tossiche, in genere, che si possono rinvenire nel mais guasto. Seguendola, sarebbe la medesima cosa, che il voler sostenere, ad es., che la sifilide, la quale pur ci presenta tante varietà nelle sue manifestazioni e nel suo decorso, possa originarsi da sostanze diverse, sieno infettive o tossiche, prive del carattere della specificità. Infine, ognuno deve ammettere che partendo da un criterio corrispondente a quanto vale per ogni malattia infettiva, o prodotta da veleni microbici (tossine), nello studio della etiologia della pellagra debbano trovare apprezzamento sopratutto quelle osservazioni le quali sieno guidate appunto dal concetto dell'azione di un agente specifico.

Le numerevoli ricerche, tendenti a scoprire nel granturco alterato, oppure nel contenuto intestinale, o nell'organismo di individui pellagrosi, un peculiare germe della malattia, hanno dato sinora risultati negativi. La ricca e svariata flora microbica del granturco, sia esso sano od alterato, ci mostra che le specie di microrganismi che vi si riscontrano, sono le medesime che si trovano anche in altri alimenti, e tutte oltremodo diffuse in natura. Il guasto del cereale è cagionato da condizioni le quali favoriscono l'attività biologica di quei microrganismi, di cui, a seconda del caso, una o più specie acquistano la preponderanza sulle altre. Donde la diversità del granturco guasto, il quale una volta è ammuffito per l'azione di penicilliacee, aspergillinee, mucorinee; un'altra è alterato per quella di una

o più specie di batteri, ed anche di oidii o blastomiceti. È questo un fatto innegabile, da cui si sarebbe condotti alla conclusione che non ogni granturco guasto sia capace di cagionare una malattia col carattere della specificità, quale è la pellagra. Senonchè, procedendo nel ragionamento, si dovrà pur concedere, che non riscontrandosi nel mais sano od alterato un germe del tutto specifico, e mancando questo anche nell'organismo del pellagroso, la produzione, o nel granturco, o nell'organismo con alimentazione maidica, di un veleno specifico, sia resa possibile, in seguito al processo vitale di un microrganismo dotato di potere patogeno (tossico), solo in rapporto allo speciale substrato da cui il germe ritrae il materiale utilizzato nel suo ricambio. Questa logica deduzione è consona alle nozioni che scaturiscono dalla batteriologia, e trova valido appoggio nella conoscenza di altre specifiche intossicazioni microbiche alimentari, cagionate da saprofiti comuni nelle alterazioni di determinate sostanze.

Segue ora la domanda, se nulla osta ad accettare che tale proprietà biologica di un determinato microrganismo, di produrre, cioè, in un substrato maidico, una sostanza tossica specifica, possa esplicarsi tanto estrinsecamente all'organismo dell'uomo e rispettivamente di animali, quanto nell'interno del medesimo. A mio avviso, si deve rispondere affermativamente! Per certo, tostochè si avveri la presenza del microrganismo nell'intestino, ed allo stesso tempo quella del substrato speciale, le condizioni, nelle quali si svolgerà l'attività del germe, non differiranno gran che dalle estrinseche. Il Roger, trattando delle putrefazioni gastro-intestinali, scrive: « Sembra infatti che ivi (nell'intestino) sieno riunite tutte le condizioni richieste per favorire le fermentazioni »; e più innanzi: « Si possono adunque paragonare completamente le putrefazioni gastro-intestinali alle putrefazioni che avvengono fuori dell'organismo, e si può concludere, con un motto celebre, che il canale digerente è un vero laboratorio di veleni ».

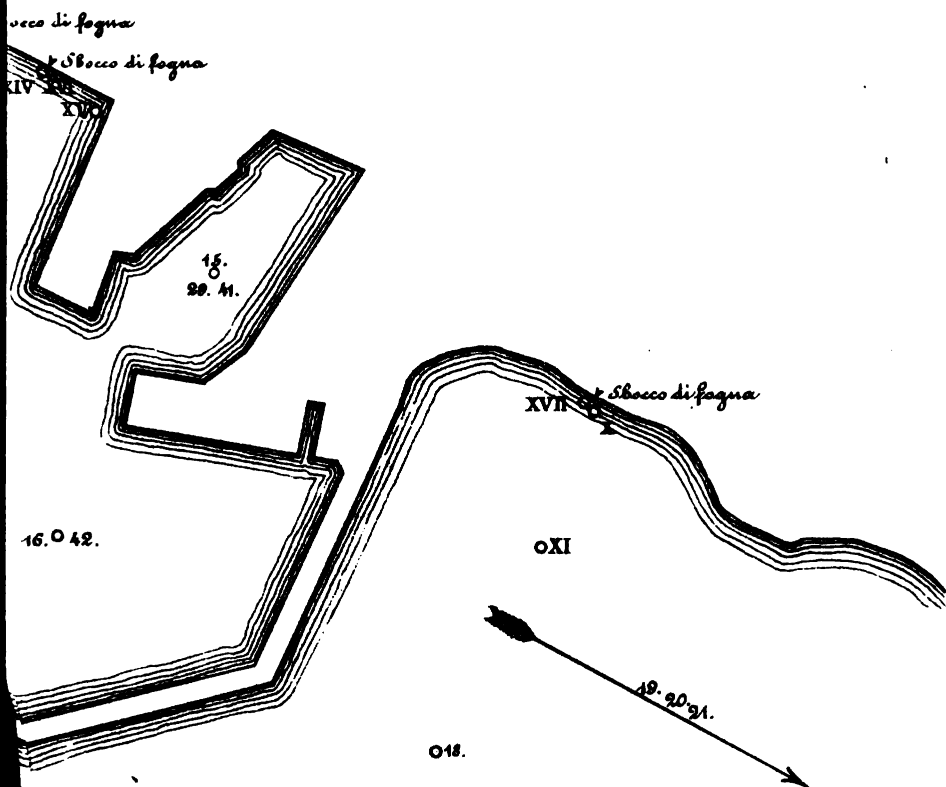
Seguendo lo svolgersi del quadro sintomatologico della pellagra, sino dal suo inizio, si constata che, sebbene con diversa intensità e con varia percezione subbiettiva, nonchè con differente durata del periodo precedente gli altri, l'individuo comincia a provare disturbi gastro-intestinali, seguìti poi da manifestazioni generali che già accennano ad un interessamento del sistema nervoso. E molto di frequente è dato di osservare come l'aggravarsi delle condizioni del sistema nervoso, faccia seguito a quello delle alterazioni nelle funzioni digerenti. Forse non si erra nell'asserire, che in poche altre malattie, come nella pellagra, nel maggior numero dei casi il periodo iniziale,

…oceo di

XIV

16.0

MALATO CALVINO - Origine e distribuzione dei germi patogeni nelle acque del porto di Cagliari



afflitto dalla pellagra, offre un campo di osservazione molto dimostrativa.

Nella disuguale distribuzione geografica del morbo, che con varia intensità si incontra in quasi tutte le provincie del settentrione ed anche in buon numero di quelle dell' Italia media, avendo sinora rispettato quasi appieno la meridionale, si constatano differenze ben notevoli nell'alimentazione della popolazione agricola. Se anche in provincie, nelle quali la pellagra è del tutto, o quasi, sconosciuta, si consuma il granturco, la non esistenza del morbo non può ragionevolmente attribuirsi al fatto che ivi non si faccia mai uso di granturco alterato. Nelle provincie degli Abruzzi ed in quella di Campobasso, senza dire di altre, è stragrande l'importazione, durante anni di cattivo raccolto, di granturco estero, e precisamente americano, che per certo non sempre è di ottima qualità; tale importazione si avvera da più anni, e tuttavia di pellagra vi sono soltanto rari casi.

Ora, procedendo nell'esposizione di cui qui mi occupo, a me importa di dichiarare sin d'adesso, che sono ben lontano dal riguardare il consumo di granturco guasto, specialmente se duri per più tempo, come indifferente ed innocuo. Al contrario, lo ritengo un fattore concomitante, ma non necessario, anche nell'etiologia della pellagra, e sopratutto nelle condizioni, delle quali dirò più innanzi. Qui affermo soltanto che non potetti mai appagarmi, nello studio della etiologia di questo morbo, all'idea che il medesimo debba ripetere la sua origine esclusivamente da sostanze tossiche preformate nel mais guasto.

Ritraggo dati più convincenti e più costanti dalla ricerca di altre peculiari condizioni, che ad ognuno è facile constatare presso le popolazioni, che danno un notevole coefficiente della pellagra. La frequenza di questa ed anche il grado di intensità nel suo regnare endemico, procedono, a mio avviso, di pari passo con due condizioni speciali dell'alimentazione maidica, le quali sono: la quantità di mais consumato, e la forma sotto cui si consuma. Un rapporto evidente fra il consumo quantitativo del granturco e l'estensione della pellagra, è cosa da ritenersi, senza alcun dubbio, come confermata. Senonchè, si deve pure riguardare il maggiore consumo di granturco in una regione, come indice di un corrispondente accostarsi alla esclusiva alimentazione maidica.

Chiunque abbia studiate le condizioni alimentari delle regioni più pellagrose, non può sconoscere che in esse la farina di granturco, almeno per buona parte dell'anno, costituisce quasi il solo

alimento della parte più povera della popolazione agricola, e che la esclusività di questa alimentazione si esagera col peggiorare delle condizioni economiche del contadino, benchè non molto rilevanti siano le oscillazioni nelle diverse annate di buono o di fallito raccolto. Almeno per la maggior parte dell'anno l'alimentazione del povero contadino, in estese regioni d'Italia, è semplicemente costituita dal consumo giornaliero di più centinaia di grammi di farina di mais, cui si unisce, ma non sempre, una scarsa quantità di altro alimento vegetale, per lo più di legumi.

Ora, a questa uniformità costante ed a questa esuberante prevalenza del consumo di granturco, un'altra condizione si aggiunge, cui deve darsi grande importanza: è la forma sotto cui viene consumato il granturco, e che costituisce una delle più salienti differenze, fra le varie regioni, ove il consumo si avvera. Sopratutto il contadino del mezzogiorno nella cui alimentazione soltanto per una epoca dell'anno, il mais ha parte, ma di rado eccessiva, lo prepara per lo più sotto forma di pani, che subiscono una avanzata cottura, e sostituiscono, ma mai del tutto, il consumo del pane di grano. Nel settentrione d'Italia, e principalmente nelle provincie notevolmente pellagrose, la polenta e la focaccia di granturco sono le forme che il contadino preferisce; ambedue si consumano spesso già alterate, e dell'alterazione la circostanza più importante è l'acidità, cui rapidamente vanno soggette la polenta e la focaccia di mais; la si deve riguardare come una importante causa efficiente nel periodo preparatorio del morbo. Nel Veneto, riguardo alla polenta, e nel Lombardo per le focaccie di granturco, ebbi opportunità, nelle mie ispezioni alle case dei contadini, di constatare la incompleta cottura dell'alimento, il suo ricco contenuto di acqua, la sua facilità all'acidificazione, cagionata, più che da muffe, da blastomiceti e da batteri. È questo, adunque, l'alimento di cui fruisce a preferenza il misero contadino delle zone pellagrose, il quale nella sua alimentazione, assai di frequente quasi esclusiva, e specialmente negli anni di maggiore penuria, ingerisce giornalmente un volume considerevole di polenta o di focaccia di mais per saziare la fame. La consuma con scarsa quantità di sale, priva quasi del tutto di condimento, e spesso conservata anche per uno o più giorni dalla preparazione. Del resto, sarebbe ozioso di insistere nel dire della inadatta alimentazione maidica delle popolazioni pellagrose.

È fatto certo che quella alimentazione è eminentemente uniforme, costituita a preferenza da alimento che si consuma sotto forma inadatta, ed il cui contenuto di acqua oltrepassa i due terzi del

peso; perciò ne risulta oltremodo eccessivo il volume ingerito ad ogni pasto; e non è meno certo che per la natura dell'alimento, e per la forma ed anche per la mancante cottura, la digeribilità riesce incompleta e quindi scarsa l'assimilazione. Ne consegue una irrazionale alimentazione, che viene a creare condizioni speciali, nelle quali devono compiersi il processo di digestione ed il passaggio dell'alimento attraverso l'intestino.

Io credo che per chiunque valuti le sopradette condizioni, debba riescire facile lo spiegarsi lo stadio, che ho già chiamato preparatorio della pellagra, consistente nei disturbi dello stomaco e del tratto intestinale. Anzitutto, la massa e la forma del cibo, introdotto nello stomaco, sono tali da non favorire, non solo l'azione dei succhi gastrici, ma neppure l'attività meccanica di quell'organo. Ed ancor meno, se si tenga presente che l'ingestione di polenta o di focaccia di granturco, acuisce il bisogno di dissetarsi col consumo di notevole quantità di bevanda, che per il povero contadino non solo è quasi sempre semplice acqua, ma il più di frequente acqua impura e di eccessiva durezza. — Da qui la decomposizione dell'alimento già nello stomaco, col liberarsi di acidi grassi, in seguito a processi di fermentazione, i quali divengono sempre più intensi, mano mano che lo stomaco, influenzato da tale alimentazione, si rende atonico, si dilata, e l'individuo viene a trovarsi in preda alla pirosi. Questo cibo indigerito, acidificato, passa nell'intestino, ed anche quivi sfugge in buona parte all'azione dei succhi digerenti, che può pure neutralizzare colla sua acidità.

Così si spiega anzitutto la quantità, per lo più molto rilevante, delle fecce emesse da individui ad alimentazione maidica, ed il contenuto in esse non solo di buona quantità di sostanze azotate non assimilate, ma anche di amido indigesto, per cui non sono sdegnate dai polli e dai maiali. Di questo incompleto processo di digestione nell'alimentazione maidica si hanno altre prove: l'aspetto delle fecce che sono il più di frequente semiliquide, o molto poltigliose; il contenuto in esse di poca bile; l'intenso odore fetido che esalano. Pertanto colla scorta delle nozioni che si possiedono sulla fisiologia e sulla patologia della digestione, si potrebbe, valutando le sopradette condizioni, giungere, anche mediante semplici deduzioni, a stabilire quali possano e debbano esserne le conseguenze, relative alla sintomatologia ed alle lesioni anatomo-patologiche, che caratterizzano la pellagra.

Comunque, ciò che più interessa, è il far rilevare che le condizioni nelle quali si effettua la eccessiva alimentazione maidica, dànno in

primo luogo un substrato favorevole, e forse del tutto speciale, alla attività biologica dei microrganismi intestinali; ed in secondo luogo, per le alterazioni della parete dell'intestino, aprono la via alla penetrazione di sostanze che sono il prodotto di quella attività, venendo a mancare la naturale difesa, che vi oppone lo strato epiteliale illeso della mucusa. Queste alterazioni della parete gastro-intestinale ripetono, senza dubbio, in buona parte la loro causa dall'azione dei prodotti di fermentazione, acida e putrida, che si compiono nel tratto digerente, ma vi deve concorrere puranco l'azione meccanica dell'alimento, coadiuvata nel suo potere irritante da quella della crusca, che, in quantità non piccola, è contenuta, di solito, nelle farine di mais, comunemente preferite dal contadino nelle contrade pellagrose.

Dopo ciò, si domanda, se in tali condizioni, nell'individuo sottoposto a siffatto genere di nutrizione, non possano formarsi sostanze tossiche, capaci di produrre un'intossicazione specifica; in caso affermativo, converrà ricercare quale sia la specie o le specie di germi, capaci di tanto, e contenute nell'intestino.

Se, a prima vista, questa ipotetica teoria può sembrare appieno contraria a quella della preformazione di veleni nel mais guasto, essa, tuttavia, non lo è di fatto. In vero, anche nella teoria da me esposta, si avrebbero, come causa principale del morbo, degli specifici processi di fermentazione del mais nell'intestino, quali si deve ritenere che possano avvenire, anche estrinsecamente all'organismo, nel granturco che sottostia all'azione di microrganismi.

Colla teoria da me seguìta non vengo affatto a negare l'importanza che pur sempre spetta al mais guasto nell'alimentazione. Astraendo dal suo valore nutritivo e dall'influenza che quell'alimento può esercitare sull'organismo con sostanze che sieno prodotti di processi di putrefazione e fermentazione, inquantochè le medesime possano concorrere ad aggravare lo stato dell'individuo, in cui si inizia la malattia, a me, seguace della assoluta specificità di questa, conviene ammettere la possibilità, che però ritengo abbia un'importanza limitata, che nel mais possano generarsi sostanze tossiche specifiche per la pellagra, o, meglio detto, se ne possa generare una, allorchè l'alterazione sia dovuta, del tutto od in buona parte, allo stesso microrganismo che la genera nell'intestino.

A corroborare la sostenibilità della mia teoria, occorreva, anzitutto, valersi della ricerca sperimentale, la quale preparasse, in certa guisa, la base necessaria all'osservazione clinica.

Nel secondo periodo degli studî da me fatti in località con en-

demia pellagrosa, avevo potuto constatare che le fecce degli individui, alimentantisi con prevalenza e talvolta quasi esclusivamente con farina di mais, e sopratutto poi quelle di persone che presentavano sintomi già manifesti del primo periodo della malattia, e quindi a prevalenza disturbi gastrici ed intestinali, mostravano un grado molto elevato di tossicità per gli animali di esperimento (conigli), essendochè per iniezione endovenosa i medesimi erano uccisi da dosi inferiori anche più della metà a quella necessaria per fecce di individui sani ad alimentazione mista ordinaria, con esclusione del granturco. Procurai di avere la conferma di questa osservazione mediante la ricerca sperimentale.

A tale scopo, già nel 1891 sperimentai con dodici conigli, di peso presso a poco eguale, e mantenuti in identiche condizioni; furono divisi in quattro gruppi, ognuno di tre animali, ed ogni gruppo ebbe alimentazione diversa. A tre dei conigli fu continuato il loro abituale vitto di foglia di cavolo; quelli del secondo gruppo si alimentarono con buona crusca di frumento, alquanto inumidita; al terzo gruppo si diedero fagiuoli secchi cotti, e l'ultimo ebbe mais sano, assai frantumato, ed inumidito un po' con acqua tiepida. Eccezione fatta per gli animali, nutriti con foglia di cavolo, nelle gabbie degli altri si tenne un recipiente con acqua, perchè potessero dissetarsi. Trascorsi 30 giorni dall'alimentazione speciale di ogni gruppo, fu saggiata più volte, a diversi periodi, la tossicità dell'estratto acquoso delle fecce dei singoli animali, che si preparò nel seguente modo: una quantità pesata di fecce, le quali cadevano su un piatto sottostante alle gabbie dei rispettivi animali, e dal quale le orine scorrevano appena giuntevi, si univano con acqua, nel rapporto di un decimo del loro peso, ed in un mortaio si riducevano a poltiglia, raccogliendole poi su un pezzo di sottile tela, la quale veniva stretta ai capi e legata; il materiale si manteneva sospeso ed immerso in acqua acidulata, coll'1 $^{0}/_{0}$ di acido cloridrico, nella quantità del doppio, meno il decimo, del peso delle fecce; durante le 36 ore di immersione si aveva cura di agitare di quando in quando il recipiente. Indi si toglieva il materiale dall'acqua, si spremeva bene, facendo cadere il liquido in quella, e filtrando poi attraverso doppio filtro di carta, ottenendosi in siffatta guisa un liquido quasi del tutto limpido. Dopo esatta neutralizzazione con soluzione di carbonato di sodio, e saggiata la tossicità dell'estratto, lo si iniettava, lentamente, nella vena marginale dell'orecchio, a conigli di peso presso a poco eguale, e sospendendo l'iniezione tostochè l'animale cominciava a presentare i sintomi, che erano un sicuro segno dell'imminente morte.

Ora la lunga serie di esperienze, più volte ripetute, mi mostrò una notevole differenza nel grado di tossicità delle fecce degli animali. in rapporto al vario genere di alimentazione cui erano tenuti. Le fecce dei conigli, nutriti con fagiuoli, erano le meno tossiche; seguivano quelle degli alimentati con cavolo, indi di quelli mantenuti a crusca, ed infine le più tossiche provenivano dai tre animali nutriti con mais. Ma, mentre la differenza nella tossicità delle fecce dei primi tre gruppi di animali (fagiuolo, cavolo, crusca) non oltrepassò mai il rapporto di 1:2, il medesimo salì, tra i conigli con alimentazione a fagiuoli e quelli a mais, ad 1 : 4, ad 1 : 3, 5 con quelli a cavolo, e ad 1 : 2, 5 con quelli a crusca.

Si avverò inoltre il fatto che, mentre i conigli a cavolo e crusca aumentarono alquanto in peso, e quelli a fagiuoli diedero una tenue diminuzione durante tutto il periodo della ricerca, gli animali a mais andarono mano mano perdendone sino quasi ad un terzo. Due di essi poi morirono, essendosi continuata l'alimentazione maidica, l'uno dopo 49, e l'altro dopo 64 giorni dal principio di quella. Il terzo coniglio di questo gruppo, al quale dopo espletate le ricerche sulla tossicità delle fecce, e precisamente dopo 43 giorni, si era restituita l'alimentazione con cavolo, riacquistò ben presto il suo peso primitivo. La constatazione di questi due fatti, ossia della tossicità tanto aumentata delle fecce, e della progressiva denutrizione dei tre conigli alimentati con mais sano, seguìta in due da morte, quantunque gli animali ne avessero consumato in quantità sufficiente, dando in pari tempo una quantità piuttosto notevole di materiale fecale, rafforzarono in me la persuasione che l'alimentazione maidica per sè dovesse riguardarsi come fisiologicamente inadatta, specie per il fatto di un processo di auto-intossicazione specifica nel rispettivo organismo. Per me ebbe pur valore la circostanza che, come lo dimostravano le culture fatte più volte dalle fecce dei 12 conigli, la flora microbica in esse era molto diversa, a seconda del genere di alimentazione: vidi che nelle fecce di conigli nutriti con mais e di quelli a crusca, i rappresentanti del gruppo del *b. coli* vi si trovavano in grande quantità, e relativamente scarsi per numero e per specie erano gli altri microrganismi.

Confortato dai risultati di queste preliminari osservazioni, ritenni che fosse merito dell'opera di procedere a ricerche più esatte, capaci coi loro risultati di chiarire se la teoria, da me seguìta, trovasse una base scientifica, in modo da darle diritto ad essere presa in considerazione e trasportata nel campo clinico. E sin d'ora mi giova affermare che tale è stato lo scopo di questo lavoro, nè pretendo di

avere con esso risoluta del tutto l'ardua questione dell'etiologia della pellagra, ma soltanto di apportare un contributo a sostegno di una, che chiamerò tuttora teoria ipotetica, però degna, secondo me, di ulteriori studi.

Poichè nelle ricerche da me eseguite colle fecce di numerosi individui, sani e pellagrosi, con alimentazione prevalentemente maidica, quale è quella di contadini di regioni con pellagra endemica, aveva potuto constatare con certezza che la rispettiva flora, in riguardo a specie di batteri, era molto povera, e che sempre vi aveva grande predominio e talfiata vi si rinvenivano quasi i soli bacilli del gruppo del *b. coli*, mi parve che su questo in ispeciale modo dovesse fermarsi la mia attenzione, per investigare se a questo microrganismo spettasse una speciale importanza nell'etiologia della pellagra. Ritenni, che ad acquisire utili nozioni in proposito convenisse procedere con speciale indirizzo, e dirò quasi a vari periodi nelle ricerche sperimentali. Occorreva, anzitutto, studiare il modo di comportarsi del *b. coli* in contatto col mais, saggiandone la virulenza ed ancor più la tossicità. E credetti eziandio importante di controllare, se nel mais e rispettivamente nelle farine di questo cereale, si riscontrasse lo stesso batterio, giungendo, in caso di risultato positivo, ad ammettere pure la possibilità, da me già accennata, di una intossicazione esogena, per la formazione di veleni tossici specifici nel mais o nelle sue farine, in rapporto alla favoritavi riproduzione del *b. coli*. Come si scorge dal lavoro del dott. Di Donna, le ricerche istituite in tale riguardo diedero risultati positivi in 27 casi su 30, non solo circa la frequente presenza e la quantità del batterio, ma ben anche circa il suo grado di virulenza, in rapporto diretto colla quale può porsi il grado di tossicità.

Concordemente ai risultati ottenuti dalle rispettive ricerche, risultò opportuno di iniziarne altre, tendenti a mostrare, per quanto è possibile, le differenze quantitative e quelle circa le proprietà biologiche, sopratutto in rapporto a virulenza e tossicità del *b. coli* nell'organismo degli animali sottoposti a diverse alimentazioni, compresavi la maidica. Gli esiti avuti mi consigliarono poi a fare intraprendere delle ulteriori ricerche sperimentali, allo scopo di conoscere la rispettiva influenza esercitata dalla alimentazione col granturco, anche sano, per rilevare le varie manifestazioni in vita, l'esito finale e le alterazioni anatomo-patologiche, presentate dai rispettivi animali, e valutandole nel loro confronto con quelle che ci dà la pellagra. A confortare poi il valore dei risultati ottenuti, ed a confermare l'ipotesi di una tossina ad azione specifica, generante i medesimi sintomi e

le stesse lesioni anatomo-patologiche, feci istituire delle ricerche con tossine di *b. coli*, provenienti da colture in brodo, e da altre con mais, ed introdotte nell'organismo dell'animale per diversa via che non fosse la digerente.

I lavori, necessari a svolgere il programma da me tracciato, furono eseguiti, nel mio Istituto, e sotto la mia direzione e controllo, da volenterosi giovani.

Nel 1897 il compianto dott. Lenti pubblicava un lavoro « Sulla virulenza e la tossicità del *b. coli*, in rapporto a varî terreni di nutrizione », dimostrando che nei substrati nutritivi, preparati con diverse sostanze alimentari del regno animale e vegetale, lo stesso batterio raggiunge il suo maggior grado di virulenza e di tossicità, in quelli preparati con mais. Questi risultati del Lenti furono pienamente confermati dalle posteriori ricerche del Paladino-Blandini, il quale allo stesso tempo osservò che il modo di comportarsi del *b. coli* era diverso nei differenti terreni, allorchè il germe proveniva dalle fecce di bambini. Quest'osservazione mi parve degna di interesse, e perciò volli fosse confermata da altre ricerche, delle quali incaricai il dott. Mazzeo, che rende qui noti i risultati del suo lavoro « Sulla differenza di attività del *b. coli* in rapporto alle diverse età dell'uomo », avendo egli istituito i suoi esperimenti con *b. coli*, provenienti da individui di diversa età, ed avendoli paragonati coltivandoli in brodo peptonizzato ed in decozione di mais. Il Mazzeo giunse alla conclusione che il *b. coli*, coltivato nel mais, aumenta più facilmente di virulenza e di tossicità, coll'aumentare dell'età dell'individuo da cui proviene.

Per le varie ricerche sperimentali con animali, consigliai sempre di servirsi dei cani, ritenendoli come i più adatti fra i comuni animali di esperimento, sia perchè onnivori, sia per il loro grado relativamente notevole di resistenza fisiologica.

Incaricando il dott. Cosuccio di eseguire uno studio comparativo sulla flora batterica intestinale e sulla tossicità del materiale fecale di cani, sottoposti a diversa alimentazione, compresa la maidica, ed affidando al dott. Spampinato il tema della « Ingestione del *b. coli* con diverse alimentazioni, in rapporto alla quantità, alla virulenza ed alla tossicità dello stesso batterio nelle fecce », ebbi di mira sopratutto di conoscere se risultati, più o meno positivi ed apprezzabili, si potessero ottenere in seguito ad un periodo non molto lungo di alimentazione maidica. A vero dire, i risultati di questi due lavori non furono molto decisivi, e permettono soltanto poche e sobrie conclusioni, le quali tuttavia mi tracciarono la via da seguire nelle ulte-

teriori ricerche, e rispettivamente confermarono il giusto indirizzo di quelle che erano già state condotte a termine, e delle altre in corso. Attinsi specialmente la convinzione della necessità che le relative esperienze dovessero protrarsi in guisa da seguire lo svolgersi della lenta influenza dell'alimentazione maidica negli animali per ottenere dati a sufficienza apprezzabili.

Le prime esperienze, istituite con tale criterio, furono fatte dal dottore Lembo, il quale ebbe per tema: « La virulenza e la tossicità del *b. coli* nell'alimentazione maidica ». Sono d'opinione che già i risultati avuti dal Lembo, abbiano una importanza tale da avvalorare la teoria dell'auto-intossicazione nell'etiologia della pellagra. Fu dopo tali ricerche che mi si dimostrò l'opportunità di uno studio più dettagliato e più preciso riguardo all'influenza dell'alimentazione con granturco non alterato, allo scopo di conoscere le modificazioni, presentate in vita dagli animali ad essa sottoposti, e non meno le lesioni anatomo-patologiche. Di questo studio assunse l'incarico il dott. Paladino-Blandini, ed i risultati, da lui avuti, possono, senza alcun dubbio, dirsi corrispondenti all'ipotesi da cui fui mosso nell'ordinare ed indirizzare i lavori ora pubblicati. Ma da quello del Paladino-Blandini non si aveva la manifesta prova che i sintomi osservati in vita e le lesioni anatomo-patologiche, constatate nei cani sottoposti ad alimentazione maidica, potessero riguardarsi come specifiche del *b. coli*. Era facile l'obbiezione che le medesime fossero la conseguenza o dell'azione speciale di altro microrganismo, o di un complesso di germi della flora intestinale, oppure anche di altro germe, o di un veleno introdotti col mais.

Partendo da tale criterio e per avere una prova diretta, assegnai al sig. Pulvirenti-Amore, lo studio delle alterazioni isto-patologiche nelle intossicazioni croniche da *b. coli*, col còmpito speciale di stabilire le differenze fra quelle dovute a tossine di brodo-culture e quelle a tossine in decozione di mais. I risultati di queste ricerche furono tali da assicurare il valore di quelli ottenuti dal Paladino-Blandini, anche in rapporto alla specificità del veleno e delle lesioni riscontrate.

I.

Ricerche sulla presenza del *b. coli* nelle farine di mais e sulla sua virulenza.

per il dott. A. DI DONNA.

Il mais fu già varie volte sottoposto ad esami batteriologici, i quali mirarono in principale modo a ricercarvi la presenza di un germe specifico, che potesse spiegare la natura infettiva della pellagra.

La teoria annunciata dal de Giaxa, che nell'etiologia della pellagra spetti una parte importante al *b. coli*, apre il campo ad una nuova serie di ricerche, in rapporto a questo germe ubiquitario, la cui importanza infettiva e tossica, e la multiforme azione patogena sono sempre più chiaramente riconosciute.

Riusciva, perciò, opportuno l'occuparsi della presenza del *b. coli* nelle farine di mais, quali sono poste in commercio, e di determinarne la virulenza, essendo noto per gli studi del Lenti, praticati in questo Istituto di Igiene, che il decotto di mais *in vitro* vale ad accrescere la virulenza del bacillo delle fecce.

Ho tenuto anche conto del numero complessivo di batterî riscontrati in ogni farina, e le cifre che riporto stanno in rapporto ad 1 grammo di essa, il quale veniva aggiunto a 10 cmc. di acqua distillata sterilizzata, per le necessarie diluizioni.

Trattandosi di un microrganismo, il cui sviluppo non è legato a speciali condizioni del terreno, preparavo le piastre con agar di reazione neutra o leggermente alcalina, quale si suole adoperare nelle comuni ricerche.

In tal modo potei riscontrare il *b. coli* in 27 su 30 farine prese in esame, isolandone diverse varietà, che mostrarono un modo alquanto differente di comportarsi verso quei varî substrati, che valgono in oggi a svelarne la specie.

Il primo carattere di cui tenni conto, comune a tutte le varietà, fu quello della mancanza del potere di fondere la gelatina; quindi

della produzione dell'indolo, che alcune varietà hanno manifestato in maniera del tutto trascurabile, o nulla, pur possedendo le altre proprietà comuni; del potere di attaccare la molecola del lattosio producendo gas e arrossando la laccamuffa, che variò notevolmente. Così del pari alcune specie coagularono il latte in circa 48 ore, mentre altre ebbero per ciò bisogno di parecchi giorni.

La virulenza venne dosata in cavie di 250 a 300 gm.; e per 5 varietà la dose mortale risultò di 0.25 cmc. °/₀ di coltura in brodo di 24 ore, iniettata nel peritoneo, di 0.50 cmc. °/₀ per 6 varietà, e di 1 °/₀ per 16.

Nel maggior numero delle cavie si ebbe la morte per setticemia; poche perirono dopo più giorni per intossicazione con un notevole dimagramento.

Le farine esaminate furono acquistate in numero di 20 a Napoli e nei paesi della provincia di Terra di Lavoro. 10 mi vennero spedite dall'Alta Italia: 3 da Parma, 3 da Reggio Emilia, 3 da Modena, 1 da Ferrara.

Infine devo dire, che in tre farine soltanto non mi riuscì di riscontrare che due o tre specie di batterî, cioè il b. sottile, il radiciforme e un micrococco. Questo fatto, osservato anche dal de Giaxa e riportato nel suo lavoro: « Contributo alle cognizioni sulla etiologia della pellagra », è da attribuirsi all'essiccamento della farina, per cui essa si depura dal maggior numero di germi, come mi è occorso di notare in alcuni campioni di farina da me esaminati, il cui contenuto e le specie di batterî tre mesi innanzi si erano dimostrati di gran lunga superiori.

Ecco i risultati dell'esame batteriologico e delle iniezioni nelle cavie.

I. — *Farine di mais acquistate a Napoli.*

	Colonie di batt. in 1 gm.	Virulenza del *b. coli*
N. 1.	226,000	0.25 °/₀
» 2.	28,900	0.50 »
» 3.	332,800	1.00 »
» 4.	80,000	1.00 »
» 5.	51,000	0.25 »
» 6.	289,875	0.50 »
» 7.	64,167	1.00 »
» 8.	630	manca
» 9.	1,400	manca
» 10.	2,500	manca

II. — *Farine acquistate nella provincia di Terra di Lavoro e di Napoli.*

	Colonie di batt. in 1 gm.	Virulenza del *b. coli*
Caserta	80,000	1.00 %
Nola	161,960	1.00 »
Casavadore	321,000	0.25 »
Maddaloni	87,050	0.50 »
Capua	28,000	1.00 »
Capodichino	89,600	0.25 »
Torre del Greco 1°.	57,200	0.50 »
Torre del Greco 2°.	166,400	1.00 »
San Giovanni	85,000	1.00 »
Portici	50,125	1.00 »

III. — *Farine di altra provenienza.*

	Colonie di batt. in 1 gm.	Virulenza del *b. coli*
Parma 1°	256,000	1.00 %
Parma 2°	216,600	0.50 »
Parma 3°	61,400	1.00 »
Modena 1°.	117,760	0.50 »
Modena 2°.	57,840	1.00 »
Modena 3°.	87,040	1.00 »
		morte dopo 5 giorni
Reggio Emilia 1°	7,800	0.25 %
Reggio Emilia 2°	330,000	1.00 »
Reggio Emilia 3°	128,000	1.00 »
		morte dopo 48 ore
Ferrara	48,000	1.00 %

Sopratutto in alcune farine, indicate col nome di provenienza, per esempio Napoli n. 1, Casavadore, Capodichino, Torre del Greco 1, Modena 2, il numero delle colonie appartenenti al *b. coli* fu molto notevole.

Ad ogni modo è degno di osservazione speciale il fatto che il *b. coli*, che si riscontra nella farina di mais, mostra assai di frequente un elevato grado di virulenza, superiore a quella che di solito possiede lo stesso germe isolato dal contenuto intestinale dell'uomo sano o di animali.

II.

Sulla differente attività del *b. coli* in rapporto alle diverse età dell'uomo

per il dott. P. Mazzeo.

A chi esamina la bibliografia relativa al *b. coli*, dal giorno in cui ne fu da Escherich palesata l'esistenza, fino ad oggi, non può sfuggire la enorme differenza di proprietà a questo germe ora dall'uno ora dall'altro osservatore attribuite, onde spesso fu, con nomi diversi, svelato in malattie varie ed in condizioni differenti. Agente di fermentazioni intestinali, influenza, aggravandolo, il corso dell'infezione tifosa; lo si crede causa dell'enterite e della dissenteria (Celli, Striga), di infezioni della vescica (Clado), di infezioni renali, ecc. Produttore d'indolo nei terreni peptonati, si è visto anche qualche volta mancare di tale proprietà; il latte può e non può essere da esso coagulato; svolge acido carbonico, nella gelatina lattosata, in abbondanza, o in scarsa quantità, o non ne svolge affatto; è molto, o poco mobile; qualche volta forma dei filamenti, e qualche altra no; ha insomma tale una meravigliosa, proteiforme attività, una capacità di assumere caratteri tanto differenti fra loro, che manca per ciò stesso il mezzo di individuarlo in una forma batterica unica, raggruppando le diverse razze in una sola classe detta del *coli-gruppo*. Gli è che, forse, a questo germe, o meglio al prototipo di questi germi differenti, deve essere assegnata come caratteristica fondamentale una squisita sensibilità alle mutazioni dell'*habitat*, mutazioni che sarebbero da per sè capaci di modificare sostanzialmente le attitudini del germe, di impartirgli certe proprietà, e di levargliene altre, conferendogli così una fisonomia svariata e particolare.

Una di queste differenze di comportamento si rileva dagli studi del Lenti e del Paladino, dei quali il primo, paragonando l'azione delle culture di *bacterium coli* in varî terreni, ne constatava la proprietà di esagerare la sua virulenza e tossicità sopratutto nei terreni nutri-

tivi con mais; l'altro, il Paladino, confermò bensì questa proprietà per il *b. coli* dell'uomo adulto, non riscontrandola, però, altrettanto manifesta e costante per il *b. coli* dei bambini.

Ho ripreso sull'argomento alcune ricerche, prefiggendomi, quindi, di studiare il comportamento del *b. coli* (virulenza, tossicità, potere di acidificazione) proveniente da fecce di persone di età differenti, e tutte in condizioni di salute perfettamente normali, evitando così l'obbiezione possibile che un particolare stato patologico avesse potuto influenzare l'attività del germe in un modo piuttosto che in un altro.

Prelevavo un' ansa di materiale dalle fecce appena emesse (per le ricerche sul *b. coli* dei bambini le fecce venivano al momento della defecazione raccolte in piccoli recipienti sterilizzati), la diluiva in acqua sterile, e facevo quindi delle culture a piatto con agar in iscatole di Petri.

Dalle colonie sviluppatesi, isolato ed identificato il *b. coli*, lo innestavo in brodo e in decozione di mais contemporaneamente, e mi servivo di culture di 24 ore (37° C.) per il dosaggio della virulenza, e di culture di cinque giorni, sterilizzate frazionalmente a 60° C, per il dosaggio della tossicità, iniettando, nell'un caso e nell'altro, le culture in esame a delle cavie intraperitonealmente. Il potere di acidificazione del germe veniva constatato dosando, a mezzo di soluzione $\frac{N}{10}$ di soda, le culture di 48 ore, filtrate su carta.

Riassumo in breve i risultati avuti:

Età degli individui	Virulenza in % del peso delle cavie		Tossicità % del peso delle cavie		Acidità (cmc. di cultura corrispondenti a 0.0143 di ac. os.)	
	cultura in brodo — cmc.	cultura in mais — cmc.	cultura in brodo — cmc.	cultura in mais — cmc.	cultura in brodo	cultura in mais
Mesi 4.	1.00	1.20	3.00	5.00	18	20
Id. 4.	1.20	1.50	3.00	4.00	21	25
Anni 1 ½	0.80	1.00	2.50	3.50	19	21
Id. 2.	0.70	0.70	2.00	2.00	15	18
Id. 5.	1.20	1.40	3.00	3.00	19	18
Id. 6.	0.80	0.80	2.00	3.00	16	17
Id. 12.	0.50	0.50	3.00	3.00	12	11
Id. 13.	0.80	0.50	3.00	2.00	14	12
Id. 26.	1.10	0.90	4.00	2.00	20	16
Id. 28.	1.20	0.80	3.50	1.50	20	15
Id. 36.	0.50	0.30	2.00	1.00	14	10
Id. 38.	1.00	0.80	3.00	2.00	19	16
Id. 46.	0.70	0.30	3.00	1.00	16	11
Id. 48.	1.50	1.00	4.00	2.00	19	16

Volendo ora riassumere i risultati ottenuti, si ha che:

1° nei due terreni nutritivi, da me studiati, nel brodo e nel mais, il *bacterium coli* presenta differenze di virulenza ed ancor più di tossicità, secondo l'età dei soggetti da cui proviene;

2° questa differenza darebbe una curva, la quale sale a misura che aumenta l'età del soggetto. E propriamente può dirsi che il punto iniziale di questa curva è rappresentato dai primi due anni della vita. A partire da questa età, il *bacterium coli* mostra progressivamente una modificazione culturale della sua virulenza e tossicità, nel senso che l'una e l'altra aumentano più facilmente, allorchè il germe viene coltivato in mais: paragonate, cioè, le colture di *b. coli* in brodo e quelle in mais, queste ultime hanno più di frequente una maggiore virulenza e tossicità delle prime.

III.

Ricerche sulla flora batterica dell'intestino e sulla tossicità del contenuto intestinale in rapporto a varie alimentazioni

per il dott. P. Cosuccio.

Lo scopo del presente lavoro fu quello di studiare l'influenza che il vario genere di alimentazione nei cani esercita sulla quantità del contenuto batterico delle fecce, e sulle diverse specie di microrganismi, nonchè quella relativa alla tossicità delle stesse fecce.

Sperimentai con tre generi di alimentazione, ossia con carne, pane e mais, sottoponendo ad ognuna due cani di taglia poco diversa. Prima di iniziare lo speciale genere di alimentazione, ho voluto conoscere quali fossero le specie microbiche e quale il numero dei microrganismi, contenuti nelle fecce dei sei cani, in condizioni ordinarie di alimentazione che consisteva in maccheroni cotti e pane.

Procurai di raccogliere per ogni cane le fecce subito dopo emesse, la qual cosa, come è noto, riesce di solito non difficile per i cani i quali, tenuti legati alla catena, si abituano a defecare quando vengono sciolti. Dalle fecce, che nel cane sano sono sempre ben formate, prelevavo una porzione, dal centro della massa, che veniva mescolata in un mortaio; indi, servendomi sempre della stessa ansa, toglievo una piccola quantità del materiale, che portavo in un tubo di vetro con tappo a smeriglio, contenente 5 cmc. di brodo e pesato esattamente. Il materiale fecale, portato coll'ansa sulla parete del tubo, veniva a poco a poco stemperato nel brodo. Una seconda pesata del tubo indicava la quantità del materiale unito. Procedevo poi alla preparazione di culture con gelatina in iscatole di Petri, preparandone tre per ogni tubo, con una quantità di 1/20, 1/50 ed 1/100 di cmc. Le scatole si mantenevano alla temperatura di 18°-20° C. Dopo tre, e se lo permetteva il numero e la rapidità di sviluppo delle colonie fondenti, di nuovo dopo 5 giorni, facevo la numerazione delle colonie (riportando il risultato ad un grammo di fecce) e procedevo allo studio delle varie specie microbiche.

Nell'eguale modo praticai delle colture con agar acidificato con acido tartarico.

Per determinare la tossicità delle fecce, queste, prelevate subito dopo emesse, si avvolgevano con un pezzo di tela, di cui si legavano i capi, e si pesavano, sottraendo il peso conosciuto della tela e del filo; si immergeva poi il tutto in un vaso contenente dell'acqua in peso eguale a quello delle fecce, lasciando per 24 ore nella ghiacciaia. Il liquido, dopo spremuto le fecce, veniva filtrato attraverso un piccolo filtro di asbesto di Maignain. La tossicità dell'estratto si saggiava con iniezioni nelle vene di conigli, sospendendo l'iniezione tostochè l'animale cominciava a mostrare i primi sintomi dell'intossicazione, i quali, come è noto, si manifestano ben presto, allorquando la quantità del liquido iniettato corrisponde alla dose letale.

Adottai gli stessi metodi, anche per le ulteriori ricerche, durante le speciali alimentazioni.

Tanto nel primo periodo, che fu quello di alimentazione ordinaria per tutti e sei i cani, come pure nel secondo, ossia durante l'alimentazione speciale, feci quattro volte, a varie distanze, le colture in iscatole, e procedetti a due determinazioni della tossicità nel primo periodo, e nel secondo a quattro, praticandone cinque soltanto per i cani con alimentazione maidica.

Riguardo al genere di alimentazione, una coppia dei cani fu nutrita con buona carne di manzo cotta; un'altra con pane di seconda qualità inumidito con acqua ed aggiuntovi dell'olio di oliva; e la terza con polenta, fatta con farina di mais sano, cui era aggiunto del sale ed un po' di sugna.

Riporto ora i risultati, ottenuti nelle ricerche, notando che in quelle riguardanti la flora batterica, ho tenuto conto anche dello sviluppo sull'agar acido di colonie di blastomiceti.

I risultati delle colture, riguardo al numero delle colonie sviluppatesi, si riferiscono ad un grammo di fecce, e quelli circa la tossicità sono espressi colla quantità di estratto iniettato in rapporto percentuale al peso dell'animale.

Cane N° 1.

	Primo periodo dal 31 dicembre 1902 al 19 gennaio 1903: alimentazione ordinaria				Secondo periodo dal 20 gennaio al 28 febbraio 1903: alimentazione con carne			
	Sviluppo di colonie			Tossicità °/₀ del peso del coniglio	Sviluppo di colonie			Tossicità °/₀ del peso del coniglio
	batteriche		di blastomiceti		batteriche		di blastomiceti	
	assieme	fondenti			assieme	fondenti		
1°	67,620,000	0	0	1. 17	2,414,000	0	0	1. 54
2°	35,590,000	30,000	0	1. 20	164,750,000	0	0	2. 23
3°	11,350,000	0	0	—	22,237,000	0	0	0. 95
4°	17,200,000	0	0	—	74,675,000	0	0	0. 89

Cane N° 2.

	Primo periodo dal 5 al 22 gennaio 1903: alimentazione ordinaria				Secondo periodo dal 23 gennaio al 28 febbraio 1903: alimentazione con carne			
	Sviluppo di colonie			Tossicità °/₀ del peso del coniglio	Sviluppo di colonie			Tossicità °/₀ del peso del coniglio
	batteriche		di blastomiceti		batteriche		di blastomiceti	
	assieme	fondenti			assieme	fondenti		
1°	60,706,000	0	0	1.90	48,875,000	0	0	1. 23
2°	32,845,000	74,000	630,000	1. 81	83,875,000	0	0	3. 07
3°	17,600,000	400,000	0	—	332,450,000	0	0	1. 16
4°	—	—	—	—	201,575,000	0	0	1. 01

Cane N° 3.

	Primo periodo dal 31 dicembre 1902 al 20 gennaio 1903: alimentazione ordinaria				Secondo periodo dal 21 gennaio al 24 febbraio 1903: alimentazione con pane			
	Sviluppo di colonie			Tossicità °/o del peso del coniglio	Sviluppo di colonie			Tossicità °/o del peso del coniglio
	batteriche		di blastomiceti		batteriche		di blastomiceti	
	assieme	fondenti			assieme	fondenti		
1°	8,805,000	0	0	0. 83	140,994,000	72,000	0	0. 99
2°	31,344,000	0	0	0. 83	183,666,000	16,000	0	0. 46
3°	1,408,000	0	0	—	4,118,000	0	0	0. 38
4°	68,050,000	0	0	—	11,475,000	0	0	0. 40

Cane N° 4.

	Primo periodo dal 13 al 22 gennaio 1903: alimentazione ordinaria				Secondo periodo dal 23 gennaio al 24 febbraio 1903: alimentazione con pane			
	Sviluppo di colonie			Tossicità °/o del peso del coniglio	Sviluppo di colonie			Tossicità °/o del peso del coniglio
	batteriche		di blastomiceti		batteriche		di blastomiceti	
	assieme	fondenti			assieme	fondenti		
1°	28,862,000	0	0	1. 06	43,361,000	0	0	4. 56
2°	86,087,000	0	25,000	1. 96	3,037,000	0	0	3. 85
3°	18,100,000	0	0	—	1,175,000	0	0	1. 95
4°	21,350,000	0	0	—	8,921,000	0	0	0. 88

Cane N° 5.

	Primo periodo dal 17 al 25 novembre 1902: alimentazione ordinaria				Secondo periodo dal 26 novembre 1902 al 12 gennaio 1903: alimentazione con mais			
	Sviluppo di colonie			Tossicità °/o del peso del coniglio	Sviluppo di colonie			Tossicità °/o del peso del coniglio
	batteriche		di blastomiceti		batteriche		di blastomiceti	
	assieme	fondenti			assieme	fondenti		
1°	22,430,000	0	0	2. 36	8,850,000	0	875,000	3. 97
2°	2,995,000	0	0	1. 32	5,150,000	25,000	75,000	1. 30
3°	64,287,000	0	0	—	62,643,000	0	3,000	1. 90
4°	4,136,000	9,000	0	—	92,810,000	0	10,000	1. 43
5°	—	—	—	—	—	—	—	0. 78

Cane N° 6.

	Primo periodo dal 17 al 25 novembre 1902: alimentazione ordinaria				Secondo periodo dal 26 novembre 1902 al 12 gennaio 1903: alimentazione con mais			
	Sviluppo di colonie			Tossicità °/o del peso del coniglio	Sviluppo di colonie			Tossicità °/o del peso del coniglio
	batteriche		di blastomiceti		batteriche		di blastomiceti	
	assieme	fondenti			assieme	fondenti		
1°	7,643,000	0	0	2. 60	19,325,000	0	1,875,000	5.03
2°	2,727,000	0	0	1. 13	3,928,000	43,000	3,000	4. 12
3°	70,764,000	1,514,000	0	—	4,750,000	0	62,000	3. 18
4°	4,870,000	150,000	0	—	54,566,000	0	0	2. 37
5°	—	—	—	—	—	—	—	0. 91

Dallo studio delle varie specie dei batterî risultò la incostanza e relativamente lo scarso numero delle fondenti, e si rilevò allo stesso tempo la notevole prevalenza, talvolta raggiungente quasi l'esclusività, di colonie appartenenti al gruppo del *b. coli*. Inoltre merita speciale attenzione il fatto della presenza quasi costante di blastomiceti, in variante quantità, nelle fecce dei due cani alimentati con mais, mentre nelle altre ricerche non si ebbero a riscontrare che due volte, una nelle fecce del cane n. 2 della prima coppia, ed una in qnelle del n. 4 della seconda, però, ambedue le volte, nel periodo di alimentazione ordinaria.

Alla presenza di blastomiceti nelle fecce è bene dare una importanza, inquantochè potrebbesi considerarla come indice di modificata reazione delle stesse, capace di influire sui processi biologici dei batterî abituali dell' intestino, imprimendo caratteri diversi ai loro prodotti di tossicità.

Risulta poi dalle istituite ricerche, che la diversità dell'alimentazione non esplica un'azione palese, sotto il punto di vista quantitativo della flora batterica, riscontrandosi, per tutti i cani, come fu già constatato da altri osservatori, oscillazioni molto ampie nel numero dei microrganismi, indipendentemente dal genere di alimentazione. Al più si potrebbe asserire che il massimo nel quantitativo dei batteri si ebbe nell'alimentazione carnea. Manca poi, e ciò va particolarmente notato, un rapporto diretto fra il quantitativo dei batteri e la tossicità delle fecce. Naturalmente, nell'apprezzare i fattori, che possono modificare la tossicità delle fecce, conviene, senza dubbio, tener conto delle condizioni individuali, ed io credo che a tale fatto si debba ascrivere la tossicità elevata anche nell'alimentazione ordinaria delle fecce del cane n. 4. — Ciò che sopratutto m' importa di rilevare, è che l'uniformità della alimentazione speciale, qualunque essa sia, pare esplichi un'influenza nel senso che, potendosi avere dapprima una diminuzione della tossicità, questa poi va gradatamente aumentando. Un tale fatto lo vediamo manifestarsi a preferenza nei cani sottoposti ad alimentazione con pane ed in quelli con mais.

Senonchè, quantunque dalle suesposte ricerche non risulti una influenza manifesta e del tutto speciale, sia sulla flora batterica, sia sulla tossicità in genere delle materie fecali, in rapporto delle diverse alimentazioni, tuttavia si constatò un fatto notevole, poichè mentre i cani mantenuti a carne e quelli a pane conservarono il loro peso, ed anzi questo nei due animali a carne aumentò, nei due ad alimentazione maidica si ebbe una notevole diminuzione, ed il

cane n. 6, deperendo mano mano, e dopo aver presentato un esteso eczema desquamativo, che a mezzo dell'esame microscopico si potè constatare di natura non parassitaria, morì il 18 febbraio, ossia circa dopo tre mesi dall'inizio dell'alimentazione maidica che fu continuata anche dopo compiute le ricerche.

L'autopsia, praticata subito dopo l'avvenuta morte, oltre a dimostrare lo stato molto marantico dell'animale, rivelò un reperto assai interessante riguardo all'intestino. Questo, specie nella sua prima porzione, si mostrò fortemememente iperemico, e la mucosa intestinale apparve sparsa di estese chiazze emorragiche, presentando qua e là perdite di sostanza, delle quali alcune con carattere di vere ulcerazioni, altre in via di riparazione.

L'altro cane ad alimentazione maidica sopravvisse, e, sottoposto nuovamente ad alimentazione ordinaria, cominciò ad aumentare in peso.

IV.

L'ingestione del *b. coli*, durante diverse alimentazioni, in rapporto alla tossicità, alla quantità ed alla virulenza dello stesso batterio nel contenuto intestinale

per il dott. G. Spampinato.

Il prof. de Giaxa mi indicava, come tema di un lavoro sperimentale, di ricercare se il *b. coli* subisce, per il passaggio attraverso l'intestino di cani, mantenuti a varie alimentazioni, un aumento della sua virulenza, studiando pure se assieme a tale aumento si verificasse anche quello della tossicità delle fecce, prendendo in ispeciale considerazione l'influenza della alimentazione maidica.

Ho istituito le relative ricerche, servendomi di cani, ed adottando tre differenti generi di alimentazione. Il periodo delle ricerche colle alimentazioni speciali fu preceduto prima da uno, fatto cogli stessi animali, tenuti a pasto ordinario, consistente alternativamente in pasta, legumi e residui di cucina; indi seguì un secondo periodo cogli animali ai quali, tenuti alla stessa alimentazione, veniva somministrato il cibo, ad ogni pasto (due volte al giorno), dopo aggiuntavi l'intera patina di una cultura in agar di *b. coli*, di 24 ore, a 37° C., sospesa uniformemente in acqua. Nell'ultimo periodo si somministrò l'alimentazione speciale coll'aggiunta della stessa quantità di coltura di *b. coli*. Questo aveva una virulenza abbastanza elevata e determinata, la quale fu mantenuta quasi costante per tutta la durata delle esperienze, a mezzo di passaggi nelle cavie.

Per ognuno dei cani e per ogni periodo di trattamento, ho determinato quattro volte il numero di colonie sviluppatesi, riferite ad un grammo di fecce, ed ho fatto due saggi della virulenza del *b. coli*, da esse isolato.

Per conoscere il numero dei batteri adoperai le fecce appena emesse o poco dopo, prelevandone dal centro una piccola ansa di materiale, che portavo e distribuivo uniformemente in un tubo con 5 cmc. di

brodo, previamente pesato. L'aumento in peso, dato da una seconda pesata, mi indicava la quantità di fecce unite al brodo. Da questa diluizione prendevo 1/20, 1/50 ed 1/100 di cmc., innestando tubi di gelatina, a reazione leggermente alcalina, e tubi di agar glucosato o leggermente acidificato. Seguendo le necessarie norme preparavo scatole di Petri, mantenendo queste alla temperatura di 18-20° C., e precedevo alla numerazione delle colonie sviluppatesi dopo 3-4 giorni.

Per il dosaggio della tossicità delle fecce, mi servii del loro estratto acquoso, ottenuto dopo 24 ore di infusione delle fecce in quantità d'acqua eguale in peso, filtrando dapprima attraverso filtro di carta molto porosa, ed indi attraverso un filtro di Chamberland. L'estratto veniva iniettato lentamente nella marginale dell'orecchio dei conigli, sospendendo l'iniezione tostochè l'animale cominciava a presentare i sintomi precursori della sua morte. Il grado di tossicità viene espresso nel rapporto percentuale al peso dell'animale.

La virulenza del *b. coli*, proveniente dalle fecce, la determinai, coltivando in brodo nutritivo il bacillo tolto da colonie sviluppatesi dalle scatole con gelatine, ed iniettando le culture di 24 ore in dose varia nel cavo peritoneale alle cavie.

L'alimentazione speciale, cui furono sottoposti i 6 cani in esperimento, fu: per 2 di carne bovina cotta, per 2 di pane bigio, e per 2 di polenta, preparata con farina di mais di buona qualità con aggiunta di sale e sugna. Il cibo veniva porto agli animali in quantità tale da assicurarne la sazietà.

Nelle unite tabelle si trovano esposti i risultati degli esperimenti per le 3 coppie di cani, ognuna delle quali ebbe la speciale alimentazione.

1ª *Coppia di cani.*

	Cane *A* (peso gm. 7000)					Cane *B* (peso gm. 5400)				
	Colonie sviluppatesi di			Tossicità delle fecce % del peso del coniglio	Virulenza del *b. coli*	Colonie sviluppatesi di			Tossicità delle fecce % del peso del coniglio	Virulenza del *b. coli*
	batteri	blastomiceti	muffe			batteri	blastomiceti	muffe		
	Primo periodo (alimentazione ordinaria).									
1°	24,064,000	0	0	0.60	..	5,025,000	0	0	0.40	..
2°	3,243,000	0	0			18,453,000	0	10,000		
3°	5,347,000	0	0	0.46	..	4,152,000	0	0	0.41	..
4°	11,499,000	0	0			12,533,000	0	0		
	Secondo periodo (alimentazione ordinaria e *b. coli*).									
1°	214,260,000	0	0	1.00	ingerito: dose m. l. 0.80 %	93,217,000	67,000	50,000	0.80	ingerito: dose m. l. 0.80 %
2°	98,283,000	0	0			30,488,000	0	0		
3°	160,471,000	0	0	1.00	isolato: dose m. l. 0.85 %	50,650,000	0	0	0.60	isolato: dose m. l. 0.70 %
4°	152,069,000	0	0			73,110,000	100,000	0		
	Terzo periodo (alimentazione con carne e *b. coli*).									
1°	80,000,000	0	0	1.60	ingerito: dose m. l. 0.70 %	737,400,000	0	0	1.40	ingerito: dose m. l. 0.70 %
2°	168,066,000	0	0			238,300,000	0	0		
3°	144,000,000	0	0	1.80	isolato: dose m. l. 0.90 %	450,750,000	0	0	1 90	isolato: dose m. l. 0.80 %
4°	104,100,000	10,000	0			524,950,000	35,000	0		
	Peso degli animali alla fine dell'esperimento:									
	gm. 7400					gm. 6000				

2ª Coppia di cani.

	Cane *C* (peso gm. 6300)					Cane *D* (peso gm. 5800)				
	Colonie sviluppatesi di			Tossicità delle fecce % del peso del coniglio	Virulenza del *b. coli*	Colonie sviluppatesi di			Tossicità delle fecce % del peso del coniglio	Virulenza del *b. coli*
	battori	blastomiceti	muffe			batteri	blastomiceti	muffe		
	Primo periodo (alimentazione ordinaria)									
1°	10,350,000	0	0	0.90	..	6,350,000	0	0	1.30	..
2°	6,750,000	0	0			2,150,000	0	0		
3°	4,199,000	0	15,000	0.70	..	8,275,000	0	0	1.50	..
4°	9,832,000	0	0			3,603,000	0	0		
	Secondo periodo (alimentazione ordinaria e *b. coli*).									
1°	108,000,000	0	0	0.90	ingerito: dose m. l. 0.40 %	20,700,000	0	0	1.50	ingerito: dose m. l. 0.40 %
2°	156,270,000	0	0			453,320,000	0	0		
3°	90,397,000	0	0	0.80	isolato: dose m. l. 0.80 %	97,595,000	0	15,000	1.50	isolato: dose m. l. 0.80 %
4°	122,483,000	0	0			327,132,000	20,000	0		
	Terzo periodo (alimentazione con pane e *b. coli*).									
1°	innumerevoli	0	0	0.90	ingerito: dose m. l. 0.60 %	46,377,000	0	5,000	0.85	ingerito: dose m. l. 0.60 %
2°	562,350,000	0	750,000			27,392,000	37,000	0		
3°	673,823,000	427,000	0	0.70	isolato: dose m. l. 0.40 %	54,720,000	150,000	0	0.75	isolato: dose m. l. 0.40 %
4°	700,000,000	380,000	0			45,650,000	110,000	0		
	Peso degli animali alla fine dell'esperimento:									
	gm. 6000					gm. 5750				

3ª Coppia di cani.

	Cane *E* (peso gm. 5900)					Cane *F* (peso gm. 7200)				
	Colonie sviluppatesi di			Tossicità delle fecce % del peso del coniglio	Virulenza del *b. coli*	Colonie sviluppatesi di			Tossicità delle fecce % del peso del coniglio	Virulenza del *b. coli*
	batteri	blastomiceti	muffe			batteri	blastomiceti	muffe		
	Primo periodo (alimentazione ordinaria).									
1°	10,583,000	0	0	2. 04	..	2,218,000	0	12,000	0. 70	..
2°	20,970,000	0	0			73,400,000	0	25,000		
3°	4,165,000	0	12,000	1. 20	..	4,938,000	0	6,500	1. 63	..
4°	3,458,000	0	0			4,933,000	0	8,000		
	Secondo periodo (alimentazione ordinaria e *b. coli*).									
1°	6,060,000	0	0	1. 67	ingerito: dose m. l. 0. 45 %	14,025,000	0	0	0. 90	ingerito: dose m. l. 0. 45 %
2°	12,700,000	0	0			23,805,000	355,000	0		
3°	12,150,000	60,000	0	2. 10	isolato: dose m. l. 0. 65 %	4,850,000	515,000	0	1. 35	isolato: dose m. l. 0. 60 %
4°	170,550,000	1,050,000	0			34,768,000	62,000	0		
	Terzo periodo (alimentazione con mais e *b. coli*).									
1°	41,855,000	865,000	0	0. 80	ingerito: dose m. l. 0. 50 %	31,063,000	22,000	0	1. 22	ingerito: dose m. l. 0. 50 %
2°	20,080,000	350,000	0			146,650,000	120,000	10,000		
3°	117,809,900	50,000	9,000	1. 45	isolato: dose m. l. 0. 10 %	451,650,000	23,000	0	1. 79	isolato: dose m. l. 0. 30 %
4°	7,150,000	60,000	0			256,300,000	50,000	0		
	Peso degli animali alla fine dell'esperimento:									
	gm. 4000					gm. 6100				

Valutando i risultati ottenuti, appare anzitutto evidente che l'ingestione del *b. coli*, anche con alimentazione ordinaria, porta seco un aumento di questo nel contenuto intestinale, la cui quantità già d'ordinario è tanto rilevante, per non dire talvolta esclusiva nelle fecce dei cani. Scorgiamo poi, che per i tre diversi generi di alimentazione, carne, pane, mais, non si esplica una influenza costante sull'aumento del *b. coli*, avvegnachè, in ognuna delle tre coppie di cani, uno degli animali presenta un aumento più o meno notevole, mentre l'altro dà cifre presso a poco eguali a quelle del periodo antecedente. Così pure non appare manifesta un'influenza da parte delle diverse alimentazioni, nè in rapporto alla tossicità delle fecce, nè in rapporto all'aumento di virulenza del *b. coli*, isolato dalle medesime, di fronte a quelle del germe ingerito dagli animali.

Però, un fatto è degno di osservazione: tutti i sei cani ricevettero ad ogni pasto la medesima quantità di *b. coli*, unita al cibo. Ora, quelli con alimentazione a carne aumentarono alquanto in peso nel breve periodo dell'esperimento; quelli con pane non subirono una variazione degna di nota, mentre presso i due nutriti con mais si verificò una diminuzione molto notevole in rapporto alla brevità del tempo. Quindi, se si esclude che tale diminuzione in peso sia dovuta ad insufficiente alimentazione, conviene ammettere che la medesima possa ascriversi a condizioni speciali del contenuto intestinale di fronte al *b. coli*, con formazione di speciali sostanze tossiche nell'intestino, confortando tale asserzione i risultati degli esperimenti del Lenti e di altri, dai quali si rileva che il *b. coli* in terreni nutritivi di mais aumenta di molto nella sua tossicità, anche senza mostrare un maggiore rigoglio di vegetazione.

Ad ogni modo ritengo, che i risultati ottenuti possano incoraggiare allo studio sperimentale della influenza che l'alimentazione maidica, più o meno esclusiva, ed anche con mais sano, protratta per più tempo, può esercitare sull'organismo in seguito alla produzione di sostanze tossiche e specifiche da parte dei microrganismi abituali dell'intestino ed in ispecie del *b. voli.*

V.

Della virulenza e tossicità del *bacterium coli* nell'alimentazione maidica

per il dott. S. Lembo.

In una memoria comparsa nel 1897, il Lenti per il primo metteva in rilievo, come radicali differenze si possano indurre nella virulenza e nella tossicità di una stessa varietà di *b. coli*, allorchè si muti il terreno di cultura di quel germe, adoperandò, cioè, terreni varii, preparati con sostanze animali o vegetali. Il Lenti poi arrivava a dimostrare che, fra tutti i terreni prescelti, il mais si mostra come il meglio dotato della proprietà di conferire il massimo di virulenza al *b. coli*, e di tossicità alle sue culture.

Più tardi il dottor Paladino ripeteva lo studio del Lenti, e ne confermava i risultati ottenuti, facendo tuttavia notare che i medesimi si avevano a preferenza con *b. coli* proveniente dalle fecce di adulto, piuttosto che con quello isolato dalle fecce dei bambini.

Restava pertanto avvalorato sempre più, ed anche completato il concetto che, *data una stessa specie batterica, basta mutare il substrato nutritivo, perchè notevoli modificazioni s'inducano nelle sue proprietà biologiche.* Questa, però, è una prova fatta e dimostrata *in vitro*; io per consiglio del Prof. de Giaxa, cercai di indagare, *se un uguale risultato si avesse anche nell'organismo animale.* — Espongo i risultati delle esperienze eseguite, dopo aver ripetute in parte le ricerche in vitro del Lenti e Paladino.

Isolai per i primi esperimenti un *b. coli* dalle fecce di un adulto di circa 40 anni, in ottime condizioni di salute. Il germe isolato dava tutte le reazioni caratteristiche del *b. coli*, e con esso innestai 4 matracci di Erlenmeyer, dei quali due contenenti cmc. 200 per ognuno di brodo nutritivo comune e gli altri due la stessa quantità di decozione di mais, preparata secondo la tecnica seguìta dal Lenti. Misi i quattro matracci al termostato a 37° C. per 48 ore; indi ne sterilizzai due - uno con decozione di mais, e l'altro con brodo - frazionatamente a 60° C. per tre giorni. — Procedetti al dosamento della virulenza e tossicità delle rispettive culture, mediante iniezioni intraperitoneali alle cavie, cui anche le colture sterilizzate per saggiarne la tossicità, si iniettavano senza che venissero filtrate, e solo previa agitazione.

Riassumo nel quadro seguente i risultati ottenuti.

Dosamento della virulenza.

Cavia	Cultura in brodo			Cultura in mais		
	Peso — grammi	% del peso in cmc.	Esito	Peso — grammi	% del peso in cmc.	Esito
1	375	0.10	sopravvive	410	0.10	sopravvive
2	390	0.25	»	400	0.25	morta in 36 ore
3	350	0.40	»	415	0.40	» 24 »
4	405	0.55	»	390	0.55	»
5	380	0.70	»	385	0.70	»
6	400	0.85	»	415	0.85	»
7	395	1.00	morta prima di 36 ore	420	1.00	»
8	405	1.15	» 24 »	390	1.15	»

Dosamento della tossicità.

Cavia	Cultura in brodo			Cultura in mais		
	Peso — grammi	% del peso in cmc.	Esito	Peso — grammi	% del peso in cmc.	Esito
1	300	0.30	sopravvive	395	0.30	sopravvive
2	390	0.70	»	380	0.70	»
3	395	1.10	»	390	1.10	morta prima di 36 ore
4	410	1.50	»	405	1.50	»
5	385	1.90	»	400	1.90	»
6	400	2.30	»	415	2.30	» » 24 »
7	415	2.70	»	410	2.70	»
8	410	3.10	»	415	3.10	»

Come si vede dalla tabella di questa prima serie di esperimenti, *risulta una indiscutibile conferma delle osservazioni del Lenti e del Paladino: la decozione di mais, in confronto al brodo nutritivo, ha il potere di esagerare notevolmente la virulenza del* b. coli *e la tossicità della sua cultura.*

***

Ritenni poi interessante il ricercare se la tossicità riscontrata dovesse a preferenza ascriversi alle sostanze contenute nel corpo dei batteri, *specialmente a sostanze nucleiniche*, ed indi se vi fosse differenza nel grado di tossicità delle medesime in rapporto al substrato di cultura.

E perciò saggiai le sostanze nucleiniche ricavate dalle culture del *b. coli* in mais e quelle da culture in brodo, procedendo nel seguente modo.

Coltivai lo stesso campione di *b. coli*, che m'era servito nelle precedenti esperienze, in brodo nutritivo ed in decozione di mais, a volumi eguali, in due matracci di Erlenmeyer a fondo molto largo, in guisa da avere uno spessore di appena cm. 4 a 5 del liquido di cultura.

Le culture tenute per parecchi giorni al termostato (37° C.) diedero uno sviluppo abbondante, con ricco deposito al fondo; dopo sterilizzazione frazionata a 60° C per tre giorni, portai il liquido su filtro di Schleicher sterilizzato, e rifiltrai sino a completa limpidezza. Lavai con acqua distillata sterilizzata, sino a che il filtrato non dava più residuo. Al materiale rimasto sul filtro, dopo raccolto in vasetto di vetro, unii della soluzione di soda caustica al mezzo per cento, e lo misi alla temperatura della stanza; dopo 24 ore, su filtro di Schleicher, lavai con acqua fino a scomparsa completa della reazione alcalina, ed essiccai la sostanza rimasta sul filtro, nell'essiccatore con acido solforico. Ottenni così dalla cultura in mais e da quella in brodo due sostanze alquanto differenti.

Quella avuta dalla cultura col mais, si presentava un po' più scura e meno facilmente polverizzabile che non quella estratta dalla cultura in brodo.

All'analisi chimica entrambe le sostanze mostrarono presenza di ferro e fosforo, ed assenza di zolfo.

Di queste due sostanze determinai il potere tossico nei conigli, e rispettivamente la dose minima totale.

Constatai che la sostanza nucleinica dal brodo uccideva un coniglio istantaneamente nella proporzione di mg. 7.5 per cento di peso del corpo, e quella dal mais nel rapporto di mg. 1.9 per cento.

La sintomatologia della intossicazione acuta per la sostanza nucleinica da *b. coli*, ottenuta sia dal mais che dal brodo, era unica: terminata appena l'iniezione l'animale con un moto di spavento alza la testa, corre all'impazzata cadendo varie volte, poi si getta su di un fianco, colpito da convulsioni cloniche generali e da irrigidimento dei muscoli della nuca; ha

qualche forzata espirazione, e muore. Tutto ciò non dura che da uno a due minuti primi. All'autopsia si nota in tutti i conigli congestione dei visceri addominali; pulmoni congesti, qualche volta sparsi di punti emorragici; cuore destro con un grosso coagulo prolungantesi nei vasi afferenti ed efferenti; cuore sinistro vuoto.

Riepilogando: le sostanze attive (nucleine?) ricavate dal corpo dei batteri provenienti dalle culture di *b. coli* in mais e quelle dal brodo, hanno effetto identico, ma le prime si mostrarono quattro volte più attive delle altre.

Accertata questa prima notevole differenza nella tossicità delle due sostanze, ho voluto provare la loro maniera di comportamento nella lenta intossicazione degli animali (conigli). Riporto i diarî dei due esperimenti, nei quali la sostanza in esame fu iniettata ai conigli nella vena marginale dell'orecchio.

Coniglio trattato con sostanza nucleinica dalla coltura maidica.

Data	Peso prima del trattamento — grammi	Quantità di nucleina inoculata — cgm.	Temperatura prima dell'iniezione — centigradi	Temperatura dopo dell'iniezione — centigradi	Peso durante il trattamento — grammi	*Osservazioni*
Febbraio 3	1430	1	39.2	39		Le temperature furono prese un'ora prima dell'iniezione ed un'ora dopo.
» 4				39.3	1415	
» 5				40.2	1320	
» 6		1	40.4	40	1325	
» 7				40.1	1365	
» 8		1.5	40.5	40	1375	
» 9				39 3	1320	
» 10				39.4	1300	
» 11		1.5	40	40.2	1240	
» 12				39.4	1210	
» 13		2	39.6	39.5	1160	
» 14		2	39.3	39.4	1125	
» 15		2	39.5	39.2	1040	Il coniglio è morto nella notte dal 15 al 16 febbraio.

Coniglio trattato con sostanza nucleinica da coltura in brodo.

Data		Peso prima del trattamento — grammi	Quantità di nucleina inoculata — cgm.	Temperatura prima dell'iniezione — centigradi	Temperatura dopo dell'iniezione — centigradi	Peso durante il trattamento — grammi	*Osservazioni*
Febbraio	9	1540	2	39. 4	39. 2		Durante tutto il periodo dell'esperimento, l'animale non mostrò che, dopo le iniezioni con dosi maggiori, una leggiera dispnea.
»	10				39. 4	1540	
»	11				39. 2	1360	
»	12		2	39. 5	39. 2	1395	
»	13				39. 2	1355	
»	14				39.4	1345	
»	15				40	1345	
»	16		3	40	39. 6	1305	
»	17				40	1280	
»	18		3	40. 1	40	1285	
»	19				40	1270	
»	20		4	39. 9	39. 6	1240	
»	21				39. 5	1310	
»	22		4	40. 2	40	1400	
»	23				40	1400	
»	24		5	40. 1	39. 7	1490	
»	25				40. 2	1470	Mantenuto l'animale in osservazione per oltre due mesi, esso riprese il peso e non presentò alcun disturbo.

Sicchè si scorge che, mentre il coniglio, trattato colla sostanza nucleinica dal mais con una dose complessiva di appena la metà di quella della sostanza nucleinica dalle colture in brodo, dopo una diminuzione in peso, morì al 13° giorno del trattamento, il secondo coniglio, che ebbe un trattamento di 16 giorni, presentò solo una temporanea diminuzione di peso, il quale poi ritornò quasi al primitivo ancora durante l'esperimento.

Risulterebbe, quindi, che:

a) *il* b. coli *adoperato esagerò la propria virulenza coltivato in decozione di mais e non meno la sua tossicità;*

b) *il grado di tossicità delle sostanze nucleiniche estratte dalle culture del* b. coli *in mais aveva un potere tossico acuto quadruplo di quelle estratte dal brodo, ed una rimarchevole differenza si notò anche nell'intossicazione cronica.*

***

Passai poi a studiare l'*effetto della ingestione di culture sterilizzate dello stesso* b. coli *nei cani.* Mi feci guidare dal concetto che toccando alla sostanza nucleinica del corpo del *b. coli* una parte se forse non unica, certamente molto importante nell'azione tossica, la sostanza non modificata dal passaggio attraverso lo stomaco, perchè intaccabile dal succo gastrico, giunta nell'intestino potesse modificarsi in guisa da essere assorbita.

In questa seconda parte degli esperimenti procedetti nel modo seguente:

preparai le solite culture in brodo ed in mais, e le sterilizzai frazionatamente a 60°C. Poi presi due cani quasi uguali in peso, e tenendoli a pasto ordinario, somministrai giornalmente insieme al pasto 10 cmc. di cultura sterile di *b. coli* in mais ad uno, e 2 cmc. all'altro. Ad un terzo cane, tenuto allo stesso pasto, somministrai 10 cmc. di cultura sterile in brodo; ne espongo il diario:

Cane con cultura sterilizzata di b. coli *in mais.*

Data	Quantità della cultura — cmc.	Peso — grammi	Vitto	*Osservazioni*
Gennaio 29	10	6500	Pane	
» 30	»		»	
» 31	»	6200	»	
Febbraio 1	»		»	
» 2	»	6000	»	Diarrea giallo verdastra.
» 3	»		»	Diarrea con qualche stria di sangue.
» 4	»	5800	»	
» 5	»		»	
» 6	»	5500	»	
» 7	»	5500	»	Ha perduto la sua vivacità.
» 8	»	5450	»	
» 9	»	5450	»	Mangia poco e a stento.
» 10	»	5450	»	
» 11	»	5400	»	
» 12	»	5400	»	Non si regge sugli arti.
» 13	»	5400	»	
» 14	»	5400	»	Rimane sdraiato tutto il giorno.
» 15	»	5300	»	id.
» 16	»	5300	»	
» 17	»			Morto nella notte dal 16 al 17.

Adunque, dopo 4 giorni l'animale scende rapidamente di peso (a gm. 6000), si manifesta una profusa diarrea giallo-verdastra, che dopo alcuni altri giorni si tinge di qualche stria di sangue. L'animale che ha perduto la sua ordinaria vivacità, dimagra gradatamente, guaisce ogni qual volta deve defecare, piglia a stento il suo pasto giornaliero, ed è tanto indebolito da passare accovacciato tutta quanta la giornata, e da doversi appoggiare a qualche cosa, allorchè lo si costringe a stare all'impiedi. Dura in questo stato di deperimento progressivo per 20 giorni; al 21° giorno muore.

All'autopsia si notò:

addome meteorico, iperemia del peritoneo parietale e viscerale con modico versamento sieroso nel cavo peritoneale; fegato congesto, ingrandito, con qualche chiazza di degenerazione grassa; milza apparentemente normale; reni congesti con qualche punto emorragico nella sostanza corticale; capsule surrenali molto ipiremiche. Aperto l'intestino, lo si trova pieno di un materiale diarroico giallastro; la sua parete mucosa è tumefatta, e chiazze emorragiche si vedono sparse qua e là in punti diversi, e si nota una fortissima tumefazione delle placche di Peyer.

Negli organi toracici si riscontra: pulmoni congesti ed in qualche punto atelettasici; il cuore destro con grosso coagulo nerastro, il sinistro vuoto.

Il secondo cane, del peso di 6400 gm., a cui somministrai giornalmente 2 cmc. della stessa cultura di *b. coli* in mais sterilizzato, fu alimentato allo stesso modo dal 19 febbraio al 28 aprile (69 giorni), nel quale giorno lo trovai morto. In vita notai gli stessi sintomi ed all'autopsia le stesse lesioni del precedente.

Trattai poi il terzo cane, del peso di 6700 gm., con cultura di *b. coli* in brodo sterilizzato a 60°, seguendo la stessa tecnica delle precedenti esperienze, e dopo un mese di trattamento osservai che il cane perdette appena 200 gm. del suo peso, non ebbe mai diarrea, nè mostrò quella profonda prostrazione di forze notata negli altri due. Lo uccisi per osservare quale azione il veleno ingerito avesse avuto sull'intestino, e constatai che essa si limitava a ben poca cosa. Si ebbe appena una modestissima ipertrofia delle placche di Peyer, mancava ogni traccia di diffusione emorragica o anche di semplice congestione della mucosa.

Come si vede, dal paragone dei risultati di queste esperienze, emerge che *introdotte per la via del tubo digerente le due tossine, mostrano un differente potere attivo, parallelo a quello di già messo in evidenza con le osservazioni precedenti.*

Modificate o no dal succo gastrico - non è questo il momento di discutere tale possibilità - delle due tossine l'una è capace di indurre considerevoli modificazioni anatomiche e funzionali nella mucosa intestinale, tanto da poter passare in circolo e determinare dei disturbi profondi nel trofismo generale dell'organismo, la qual cosa non si verifica o si verifica in proporzioni di gran lunga inferiori con l'altra, cioè con la tossina avuta dalla cultura in brodo.

Riconosciuto che la virulenza e la tossicità del *b. coli* in vitro si esagera, se coltivato in mais, riusciva opportuno di procedere ad altre ricerche per constatare: *se una simile esagerazione si avverasse puranco nell'organismo animale* (*cane*), *messo ad alimentazione maidica.*

Con altre parole, interessava indagare se un *b. coli*, portato nel tratto intestinale di un animale, assieme a sostanze alimentari di vario genere, subisse modificazioni di virulenza e tossicità, ritenendo

che il suo passaggio attraverso lo stomaco non potesse arrecare influenza veruna od al più una molto tenue sul suo potere biologico.

Saggiai anzitutto la virulenza e la tossicità, per le cavie, del *b. coli*, di cui doveva servirmi e che aveva isolato dalle fecce di un cane, alimentato con solo pane, condito con olio. Potei stabilire una virulenza corrispondente a 0.25 cmc. °/₀ del peso della cavia (la quale in seguito ad iniezione intraperitoneale moriva fra 30-36 ore) ed il grado della tossicità (colture in brodo nutritivo con peptone al 2 °/₀, di 36 ore a 37° C. e sterilizzate frazionatamente per 3 giorni a 60° C.) corrispondeva a 0.9 cmc. °/₀.

Tre cani di peso pressochè eguale furono alimentati per 3 giorni a solo pane. Al 4° giorno, isolai dalle fecce di ognuno il *b. coli*, dosandone la virulenza e la tossicità. Indi dei 3 cani, uno fu mantenuto ad alimentazione esclusivamente maidica, un altro a solo pane, ed il 3° ad alimentazione mista di fagiuoli e pasta. Giornalmente al pasto del mattino di ognuno unii la patina di una coltura su agar del *b. coli*, emulsionata in acqua sterile.

Riporto ora anzitutto il diario del cane alimentato con polenta di mais sano, aggiuntavi della sugna, ed unita giornalmente al pasto del mattino la sospensione di *b. coli*.

Durata dell'esperimento dal 19 febbraio al 10 maggio 1901.

Virulenza del *b. coli*, isolato dalle fecce, 1 cmc. °/₀; tossicità 4.3.

Peso iniziale gr. 6000. Nel corso dell'esperimento l'animale dimostrò variazioni nel peso, che si mantenne però sempre al disotto dell'iniziale e fu di gr. 5300 il giorno 10 maggio, in cui l'animale morì. Già il giorno 9 marzo si cominciò a manifestare una diarrea, che dopo 4 giorni divenne profusa, e durò sino al giorno 19 dello stesso mese. Il giorno 22 l'animale vomitò e cominciò a diminuire l'appetito. Il giorno 27 riapparve la diarrea, assai fluida e di colore giallastro, accompagnata da tenesmo, ed il 17 aprile si videro negli escrementi delle strie di sangue. Tale stato si conservò fino alla morte dell'animale, il quale andò sempre più dimagrendo ed indebolendosi.

Durante il corso dell'esperimento saggiai 3 volte la virulenza e la tossicità del *b. coli*, isolato nel solito modo dalle fecce del cane. Nel 1° saggio, eseguito il giorno 19 marzo, si ebbe una virulenza di 0.75 cmc. °/₀ del peso della cavia, ed una tossicità di 2.35 °/₀. Nel 2° saggio, praticato il 9 aprile, la virulenza corrispose a 0.50 cmc. °/₀, e la tossicità ad 1.80. La 3ª deternazione, eseguita 3 giorni prima della morte dell'animale, diede per risultate una virulenza di 0.30 cmc. °/₀, ed una tossicità di 1.25.

All'autopsia si riscontrò, di notevole, una forte iperemia dell'intestino con considerevole tumefazione delle placche del Peyer; ingrandimento ed iperemia del fegato, con iniziale degenerazione grassa, e rimarchevole congestione renale. Le culture sull'agar, fatte col sangue tolto dal cuore, rimasero sterili.

Il 2° cane, il quale dopo l'alimentazione a solo pane per 3 giorni pesava gr. 5600, ed il cui *b. coli*, isolato dalle fecce, mostrò una virulenza di 0.9 cmc. per cento, ed una tossicità di 3.5 cmc. °/₀, fu mantenuto ad alimentazione mista di fagiuoli e pasta, unitavi la sospensione di *b. coli*, dal giorno 22 febbraie al 25 aprile. Durante l'esperimento presentò dapprima una leggera diminuzione in peso (300 gr.), ma alla fine aveva superato di 200 gr. il peso primitivo. Non presentò mai verun disturbo e fu ucciso.

All'autopsia si constatò soltanto una moderata iperemia dell'intestino ed una leggera tumefazione delle placche del Peyer; il fegato un po' ingrandito e congestionato; normali la milza ed i reni.

La virulenza e la tossicità del *b. coli*, isolato dalle fecce di questo cane, e determinate 3 volte durante il periodo dell'esperimento, si scostarono di poco da quelle determinate prima di iniziarlo. Difatti la determinazione, eseguita 3 giorni prima dell'uccisione, diede una virulenza di 0.80 cmc. °/₀, ed una tossicità di 2.95 cmc. °/₀.

Il 3° cane fu nutrito con pane, aggiuntovi dell'olio e la sospensione del *b. coli*, dal 19 febbraio al 27 aprile. L'isolamento del *b. coli* dalle sue fecce, eseguito il giorno 22 febbraio, possedeva una virulenza di 0.92 cmc. °/₀ ed una tossicità di 3.45 cmc. °/₀. Anche questo animale, che durante tutto lo esperimento aumentò di 100 gr. in peso, non presentò verun sintoma anormale, ed, ucciso il 27 aprile, i suoi organi si mostrarono del tutto sani.

Il *b. coli*, isolato 3 volte dalle sue fecce, mantenne presso a poco la primitiva virulenza e tossicità; difatti nell'ultima determinazione si ebbe una virulenza di 0.90 cmc. °/₀ ed una tossicità di 3.25 cmc. °/₀.

Riassunti nel seguente specchietto i risultati dei tre esperimenti,

B. coli somministrato		Alimentazione	Durata dell'esperimento — giorni	*B. coli* isolato			
				prima		dopo	
Virulenza °/₀ del peso dell'animale — cmc	Tossicità °/₀ del peso dell'animale — cmc.			Virulenza °/₀ del peso dell'animale — cmc.	Tossicità °/₀ del peso dell'animale — cmc	Virulenza °/₀ del peso dell'animale — cmc.	Tossicità °/₀ del peso dell'animale — cmc.
0.25	0.90	Polenta	81	1.00	4.30	0.30	1.25
		Mista	63	0.90	3.50	0 75	2.95
		Pane	68	0.95	3.45	0.90	3.35

confrontando la virulenza e tossicità del *b. coli*, somministrato per ingestione, e quella dello stesso germe, isolato prima e verso la fine dell'esperimento, si rileva, anzitutto, che il tentativo fatto per conoscere se la virulenza e la tossicità di un *b. coli* somministrato per ingestione con alimenti varî vengano esagerate durante il passaggio attraverso l'intestino, deve dirsi non riuscito, inquantochè risulta che nei vari isolamenti non si raggiunse mai un grado di virulenza e tossicità almeno pari a quello, che possedeva il *b. coli* prima dell'ingestione. Però, gli stessi risultati dell'esperimento hanno un valore di grande importanza, venendo a confermare ancora una volta l'influenza dell'alimentazione maidica sul *b. coli*, contenuto nell'intestino dell'animale, scaturendo, come si scorge dal rispettivo specchietto,

un rapporto di esagerazione, per la virulenza, di 1: 0. 3, e, per la tossicità, di 4. 3: 1. 25, mentre è trascurabile quello che si riscontrò per gli altri due cani. Un ulteriore esperimento istituito valse ancor più a dimostrare che l'esagerazione della virulenza e tossicità del *b. coli*, tolto dalle fecce del cane durante l'alimentazione maidica, sia appunto da ascriversi al *b. coli* già contenuto nelle fecce.

Un cane del peso di 4400 gr., fu alimentato per 5 giorni con solo pane; isolai dalle sue fecce il *b. coli*, il quale si dimostrò virulento per la cavia nella quantità di 1 1 cmc. °/₀, e tossico in quella di 4. 5 cmc. °/₀. Il cane fu dopo, 1° febbraio, alimentato con sola polenta e sugna, e morì il giorno 21 luglio, cioè dopo quasi 6 mesi. Durante l'esperimento esso presentò una prima diminuzione in peso, e fu più volte colpito da diarrea. Però, si ristabilì ed in seguito raggiunse il peso primitivo; ma poi verso la metà di maggio cominciò a perdere gradatamente della sua ordinaria vivacità e ad alimentarsi più scarsamente, e più volte fu colto da vomito alimentare e da profusa diarrea giallo-verdastra. Nel principio di giugno alle scariche diarroiche erano commiste strie di sangue assieme a muco. Diminuì in peso; il deperimento divenne notevole, e l'animale mantenevasi a prefenza accovacciato e guaiva, quando era costretto a defecare. Vi era pure caduta dei peli, i quali con minima trazione si staccavano a fiocchetti. Verso la fine di giugno pesava 3500 gr. Tale stato ed il deperimento aumentarono sempre più ed aumentò anche il sangue nelle fecce. Il giorno 18 luglio pesava 3200. Morto il dì 21 luglio, all'autopsia si riscontrò: fegato ingrandito con degenerazione grassa; reni con emorragie puntiformi nella sostanza corticale; forte iperemia dello stomaco e dell'intestino, ed in questo si riscontrarono estese ulcerazioni, diffuse chiazze emorragiche e forte tumefazione delle placche di Peyer.

La prima determinazione del *b. coli*, isolato dalle fecce, fatta verso la metà di marzo, diede una virulenza di 0. 7 cmc. °/₀ del peso di cavia, ed nna tossicità di 1. 8 cmc. °/₀. Ambedue si mostrarono molto aumentate nell'isolamento fatto il 30 aprile, ed in quello, eseguito alla fine di maggio, si constatò una virulenza di 0. 05 cmc. °/₀, ed una tossicità di 0. 22 cmc. °/₀.

Conclusioni.

I risultati ottenuti mostrano, adunque, che il *b. coli* nell'intestino del cane, mantenuto ad esclusiva alimentazione maidica, esagera notevolmente la sua virulenza e tossicità, come avviene se sia coltivato artificialmente in terreno maidico.

I sintomi osservati in vita, e le lesioni anatomo-patologiche riscontrate nei due cani alimentati con polenta, devono senza dubbio riferirsi all'azione di tossina specifica proveniente dal *b. coli*.

I risultati poi degli esperimenti, fatti colla sostanza nucleinica del *b. coli*, coltivata in decozione di mais, e con quella dello stesso germe, coltivato in brodo, permettono di dedurre che i sopradetti sintomi e le lesioni debbano, almeno a preferenza, ascriversi all'endotossina di detto germe.

VI.

Osservazioni sull'alimentazione maidica sperimentale.

Per il dott. A. PALADINO-BLANDINI.

Lo studio della etiologia della pellagra che dal Ballardini in poi ha dato sempre tema di lavoro e di discussione a moltissimi ricercatori, non ha potuto sino ad oggi fornirci della quistione una soluzione irrefutabile. Non è quindi superfluo il portare nel dibattito nuove osservazioni, cosa che mi accingo a fare riferendo di alcune mie ricerche sperimentali, con le quali ho cercato di portare un contributo alla quistione se alla *pellagra* può darsi il valore di una malattia da autointossicazione (De-Giaxa).

Quattro cani di peso variabile dai 5 ai 9 kg., tenuti in assoluto riposo, dopo un mese di trattamento a pasto ordinario (400 gr. di maccheroni conditi con sale e 20 gr. di sugna) ingerivano giornalmente ciascuno 400 gr. di farina di mais di buona qualità (1) bollita in acqua per 20′ (polenta) e condita con sale e sugna. Di essi tre sono venuti spontaneamente a morte dopo un tempo variabile; uno è stato ucciso dopo un anno di trattamento e in un periodo in cui si mostrava profondamente deperito. Riferirò partitamente di essi la storia clinica:

CANE I. Peso kg. 7.300. — Dal 10 novembre al 12 dicembre successivo esso viene tenuto a pasto ordinario. L'animale è andato progressivamente aumentando di peso fino al giorno anzidetto in cui risulta di kg. 7.400. Emette

---

(1) La farina di mais veniva all'Istituto in quantità di 20-40 kg. alla volta. Asciutta, di un bel color d'oro, senza speciale odore di ammuffimento, mantenuta sempre in modo da evitarne l'inumidimento, esaminata varie volte chimicamente e batteriologicamente, non ha mostrato veruna alterazione.

La reazione si è mantenuta neutra o debolmente acida; la reazione dei fenoli (metodo Gosio, modificato da Antonini) è stata sempre assente. Culture a piatto su gelatina alcalina, e su agar acido glucosato, diedero in media:

specie batteriche non fondenti	N. 20.800	per gr.
id. id. fondenti	» 75	id.
muffe	» 850	id.

fecce brunastre, conformate (1), di cui doso la tossicità dell'estratto acquoso. Per ciò fare, raccolte le fecce emesse dall'animale nelle 24 ore e pesatele, vi aggiungo altrettanto in peso di acqua, e pongo in ghiacciaia per 24 ore. Trascorso questo tempo, spremute le fecce in una pezzuola, il liquido risultante viene filtrato su carta e iniettato lentamente nella marginale dell'orecchio di un coniglio - di peso non inferiore a 1600 gr. - fino al momento in cui l'animale comincia ad avere delle scosse convulsive in mezzo a cui poi muore. Eseguendo dunque in tal modo la ricerca, ho trovato:

il 10 novembre 1901	toss.	dell'estr.	....	1.60 °/₀
il 22 id.	id.	id.	....	1.50 °/₀
il 2 dicembre	id.	id.	....	1.70 °/₀
il 12 id.	id.	id.	....	1.80 °/₀

L'analisi dell'urina eseguita metodicamente ogni dieci giorni in questo primo periodo di osservazione fa notare assenza di ogni principio patologico. Eseguito il lavaggio dello stomaco il 12 dicembre, due ore dopo l'ingestione del pasto, all'esame del contenuto stomacale noto presenza di acido cloridrico (reaz. del metil violetto), assenza di acidi organici (reaz. di Uffelmann).

Comincio allora ad alimentare il cane esclusivamente con mais. Il pasto ingerito con piacere nei primi giorni, viene in seguito consumato proprio con voracità; le fecce si scolorano, ma si mantengono conformate e asciutte ed esaminate al microscopio (10 febbraio 1902) fanno vedere una grande quantità di granuli d'amido di mais più o meno intatti. Stemperate le fecce in acqua, esse impartiscono a questa una palese reazione acida. Dosandone la tossicità dell'estratto acquoso, nell'anzidetta maniera ho ottenuto:

21 dicembre 1901	toss. estr.		....	1.30 °/₀
10 gennaio 1902		id.	....	2.05 °/₀
1° febbraio	id.	id.	....	1.05 °/₀
20 id.	id.	id.	....	0.90 °/₀
9 marzo	id.	id.	....	0.45 °/₀

Parallelamente all'esagerazione della tossicità delle fecce, va lo stato di nutrizione e quindi il peso dell'animale. Questo che alla fine del 1° periodo dell'esperienza pesava kg. 7.400 perde a poco a poco di peso: scende a 7000 gr. appena nove giorni dopo l'inizio dell'alimentazione a mais (21 dicembre), poi a 6400 gr. (10 gennaio), a 6000 gr. il 20 febbraio, a 5800 il 9 marzo. Il giorno 11 marzo muore. In vita, e durante questo secondo periodo di trattamento, l'animale non ha presentato disordini del movimento; le pupille regolari e simmetriche, la mucosa buccale rosea ed umida, conservati i peli e di normale apparenza. È da notarsi solo che negli ultimi giorni di vita dell'animale intervenne una ostinata stitichezza cui seguì diarrea sierosa, abbondantissima nella giornata del 10 marzo, quella che precedette il giorno della morte del cane.

Il 15 febbraio ritirato col solito procedimento il contenuto dello stomaco vi rinvengo grande quantità di muco. Il filtrato, che ha reazione acida, non

(1) Di reazione alcalina.

fa mutare di colore la soluzione di metil violetto (assenza di acido cloridrico) mentre trasforma il colorito ametista del reattivo di Uffelmann in giallo paglierino (presenza di acidi organici).

Nell'urina si è notata (25 febbraio) l'assenza di acetone (reaz. di Legal) e tracce di albumina (leggero dealbamento dell'urina trattata con acido tricloroacetico).

All'autopsia si nota:

Milza piuttosto anemica e con sistema follicolare appariscente.

Stomaco dilatato; contiene gas, ed all'apertura fuoriesce un liquido torbido, brunastro. Sulla superficie interna della regione pilorica ed in corrispondenza della porzione a destra della grande curvatura si notano piccole emorragie puntiformi nella mucosa, emorragie che si vedono anche al gran cul di sacco. La mucosa è uniformemente spalmata di muco.

Intestino: le pareti di spessore normale. Nel duodeno sopratutto e poi anche qua e là nel digiuno e nell'ileo si vedono chiazze di piccole emorragie puntiformi coincidenti a tratti iperemici della mucosa. Nell'ileo poi, e in corrispondenza del suo bordo libero, si notano chiazze rilevate, in numero di tre, di colorito grigio-ardesiaco, ovalari e con il maggiore asse disposto nel senso della lunghezza dell'intestino, di grandezza variabile da $^1/_2$ a 2 cm. Un'altra chiazza di colorito simile alle tre precedenti, ma ampia, diffusa e non prominente, si nota verso la fine dell'ileo assieme a lunghe strie emorragiche, queste ultime in numero di cinque.

Fegato iperemico; abbastanza netto il contorno degli acini. Vie biliari leggermente dilatate.

Cistifellea dilatata, contenente bile densa, pleiocromica.

Rene normale.

Capsule surrenali: Hanno la sostanza corticale normale; la midollare invece mostra dei tratti pallidissimi di aspetto gelatinoso.

Polmoni: Iperemico il destro.

Cuore con muscolatura e apparecchi valvolari in buone condizioni. I due ventricoli sono pieni da trombi alcuni bianchi, altri rossi, voluminosi e di cui qualcuno si stende fino nell'aorta.

Asse cerebrospinale: Congestione e modico opacamento della dura madre cranica; quasi normale la dura madre spinale. Iperemia diffusa delle pie meningi, della sostanza cerebrale e del midollo spinale, il quale ultimo mostra qua e là, specie nella porzione dorsale e cervicale, piccoli punti emorragici nella sostanza grigia.

All'esame microscopico degli organi interni (1) si rivela:

Intestino: In sezioni praticate su tratti diversi dell'ileo quello che si rivela da per tutto è una uniforme distribuzione di piccoli focolai emorragici, e di ectasie vasali in tutta quanta la mucosa. I vari strati della mucosa sono edematosi, e l'epitelio in vari punti sfaldato sino a lasciar calvi i villi sottostanti, mostra in genere una aumentata metamorfosi mucosa. Manca però ogni dato obbiettivo che possa dalle sezioni dare spiegazione del colorito grigio arde-

---

(1) Per la ricerca delle lesioni anatomo-patologiche microscopiche, i vari pezzi sono stati fissati in Flemming, o in liquido di Zenker. Per il sistema nervoso ho fissato prima tutto l'asse cerebro-spinale in massa in alcool a 70°, passando poi i singoli pezzi in esame nella serie degli alcool.

siaco notato all'autopsia in vari punti e anche per estesi tratti della mucosa, ciò che mi fa ammettere quella speciale pigmentazione come l'esito di particolari processi putrefattivi intervenuti, nella covertura epiteliale degenerata della mucosa, per opera dei germi intestinali. Sezioni fatte a livello delle placche di Peyer le fanno vedere cospicuamente tumefatte con infiltrazione linfoide peri- ed interfollicolare. Spesso gli elementi linfoidi per la necrobiosi degli strati superficiali della mucosa, si mostrano completamente allo scoperto.

Preparati fatti col metodo di Weigert (colorazione nucleare al carminio e colorazione batterica al viola di Erlich), e col metodo di Nicolle (colorazione al bleu di metilene e fissazione del colore con soluzione di acido tannico) fanno vedere la totale assenza di infiltrazione batterica della mucosa.

Stomaco. Niente di anormale, salvo qualche piccola emorragia di lieve entità, specie nelle sezioni di tratti di mucosa della regione pilorica.

Pancreas: Modico rigonfiamento torbido degli elementi specifici; dilatazione vasale, piccole emorragie nel parenchima e nel connettivo interlobulare.

Fegato: Assenza di ogni nota degenerativa; note di congestione attiva dell'organo. Nel connettivo ambiente ai vasi sanguigni interlobulari si può osservare una modica infiltrazione parvicellulare.

Rene: Si accenna un principio di necrobiosi delle cellule epiteliali dei tubuli contorti: i nuclei non sono uniformemente ben colorabili, e qua e là fanno anche assoluto difetto. Le anse glomerulari sono distese, ma non presentano segni di degenerazione. Piccoli focolai emorragici nel connettivo di sostegno.

Capsule surrenali: Sostanza corticale ben conservata; sostanza midollare non molto bene colorabile, con incipiente degenerazione grassa nella zona limitante la sostanza corticale. Fortemente distesi e ripieni i vasi sanguigni; emorragie puntiformi in scarso numero e solo nella sostanza midollare.

Polmoni: Oltre le note generali di iperemia attiva, notate in tutti quanti gli altri organi interni, nulla di notevole.

Sistema nervoso: Ho limitato le mie ricerche microscopiche al midollo spinale — già tenuto in gran conto nelle affezioni pellagrose da tutti gli scrittori sull'argomento, a cominciare dal Lombroso – al ganglio solare, del quale, dopo le osservazioni del Cavazzani sulle lesioni del simpatico nelle malattie infettive, il Brugia descriveva speciali alterazioni nella pellagra, ed ai gangli infravertebrali, di cui fino ad ora, tranne un lieve accenno del Babes e del Ross, nè negli uomini pellagrosi, nè negli animali di esperimento, nessuno si è occupato.

a) *Midollo spinale:* Nei pezzi inclusi in celloidina e colorati col metodo Weigert-Breglia non si nota in nessuna parte del midollo alcuna nota degenerativa nè dei fasci, nè delle radici posteriori. Risultano invece dai tagli fatti in pezzi inclusi in paraffina e colorati con il metodo Boccardi (1) delle lesioni nelle cellule ganglionari, del tratto lombare del midollo,

---

(1) Colorazione a caldo dei tagli sparaffinati in una miscela di eritrosina e bleu di toloidina, lavaggio in acqua, differenziazione in soluzione di allume, disidratazione in alcool, diafanizzazione delle sezioni in trementina. I preparati vengono montati in balsamo.

sopratutto rilevabili nelle cellule della colonna di Klarke e del nucleo di Stilling.

Si rinvengono fra questi gruppi cellulari elementi ganglionari a contorno ancora ben delineato, con prolungamenti senza manifeste varicosità, ma con cromatolisi già abbastanza pronunciata. I granuli di Nissle, specie quelli addossati al nucleo, sono scomparsi; il protoplasma omogeneizzato lascia ancora vedere ben conservata la trama reticolare della cellula. Permangono i granuli di Nissle periferici, ultimi sempre a scomparire — come ha osservato Colucci — in tutte le affezioni degenerative delle cellule ganglionari.

In altri preparati, specie a livello della midolla dorsale, questa incipiente cromatolisi è più accentuata; il protoplasma cellulare è uniformemente omogeneo e poco colorabile. Talvolta infine la necrobiosi della cellula va fino alla degenerazione vacuolare, scomparisce il reticolo, il nucleo come se più non fosse tenuto a posto dai fili della trama protoplasmatica si sposta dal centro, e la cellula intera perde la nettezza del suo contorno. Di ben decisi focolai di sclerosi però nessuna traccia. Colorando i tagli con ematossilina ed eosina tutta la sostanza grigia appare sparsa di piccole, recenti emorragie.

b) *Gangli spinali*: Degenerazione jalina e granulosa di varie cellule ganglionari; qualche cellula atrofica ha lasciato la nicchia connettivale, in cui è adagiata, piena di un detrito informe.

c) *Ganglio solare*: Anche qui degenerazione jalina e granulosa ed atrofia degli elementi specifici, con iperplasia connettivale; focolai emorragici di poca entità e di data recente.

Cane II. — Peso dell'animale kg. 5.300.

Il 10 novembre 1901 comincio ad alimentare questo cane con pasto ordinario e mantengo fino al 12 dicembre successivo questo genere di alimentazione. Durante questo primo periodo l'animale aumenta di peso fino a raggiungere kg. 5.500 il 12 dicembre.

Le urine esaminate chimicamente e microscopicamente si mostrano prive di ogni principio patologico. Nel contenuto stomacale ritirato due ore dopo il pasto, si nota: reazione acida, assenza di muco e di acidi organici, presenza di acido cloridrico libero.

Le fecce hanno reazione alcalina, sono colorate in bruno, asciutte, conformate. Mescolate a parità di peso con acqua e fattone l'estratto, questo, provato al solito su conigli per iniezione endovenosa dà i seguenti risultati:

10 novembre 1901.	Toss. estratto	. . . .	1.70 %
22 »	»	. . . .	1.60 »
2 dicembre »	»	. . . .	1.75 »
12 »	»	. . . .	1.75 »

Comincio allora, il giorno 13 dicembre, l'alimentazione a mais (400 gr. giornalmente) e la continuo fino al 15 luglio del 1902, cioè fino alla morte dell'animale. E, come nel primo caso, cominciano a poco a poco le fecce a scolorarsi, pur mantenendosi figurate; l'animale sempre voracissimo, dimagrisce; perde il suo pelo l'abituale liscezza e lucentezza, scema il peso del corpo gradatamente tanto da risultare in una pesata fatta il 19 marzo 1902 di kg. 4.500. Aumenta la quantità del materiale fecale emesso nelle 24 ore; questo animale, che durante l'alimentazione a maccheroni (novembre-di-

cembre 1901) non emetteva in media più di 80-90 gr. di fecce al giorno, giunge il 3 aprile 1902 ad emetterne fino a 250 grammi. Il cane che ha già avuto vomito una prima volta il 9 marzo, a carattere alimentare, torna a a vomitare il 3 di aprile, e nel materiale rigettato si riscontrano (reazione di Gmelin) i pigmenti biliari. Il 7 aprile appare per la prima volta la diarrea; diarrea profusa, sierosa, gialletta, sparsa di venature sanguigne, ed in cui il microscopio svela abbondantissimi granuli di amido maidico, benissimo conservati. Diluita una piccola parte (circa 1 gr.) di questo materiale in 5 cm.³ di acqua, previa bollitura e successivo raffreddamento, la tintura di jodio dà alla massa in esame tale un colorito azzurro da dare l'idea che si tratti di una pura e semplice sospensione di farina in acqua. Esaminate le urine nella stessa giornata vi trovo: $^1/_2$ $^0/_{00}$ di albumina, presenza di acetone. Nell'insieme l'animale mostrasi profondamente abbattuto; perduta l'abituale vivacità se ne sta accoccolato in un canto della sua cuccia, sordo ai richiami, restio a muoversi.

Da questo giorno però comincia a migliorare. La diarrea profusa si tramuta in una stitichezza rilevante; scompare l'acetone dalle urine mantenendosi soltanto la presenza di piccole quantità di albumina; non ha più accessi di vomito e riguadagna in peso con una certa celerità tanto da toccare il 16 maggio kg. 4.800. Va avanti così in discrete condizioni di salute sino agli ultimi giorni del maggio; torna allora a diminuire di peso e il 20 giugno successivo si riaffaccia la diarrea. Ricomincia l'animale a mostrarsi sofferente, perde progressivamente in peso, quantunque raramente accada che esso rifiuti il solito pasto; ricomparisce l'acetone e con l'acetone l'albumina nelle urine, insieme a grande quantità di indacano. Si alterna la diarrea, spesso sanguinolenta, a fasi di ostinata stitichezza; comparisce un tremore generalizzato a tutto quanto il corpo; tardi sono i movimenti; e il 15 luglio infine, dopo 4 giorni di profusa diarrea, l'animale muore. Il 13 luglio esso pesava kg. 4.100. L'estratto acquoso delle fecce, mantenutosi sempre di reazione acida, sin dal principio del 2° periodo di questa esperienza, provato al solito sui conigli, ha dato nei vari periodi, dal punto di vista della sua tossicità, le seguenti cifre:

21 dicembre	1901.	Toss. estratto	. . . .	1.31 %
10 gennaio	1902	»	. . . .	2.00 »
30 »	»	»	. . . .	1.50 »
15 febbraio	»	»	. . . .	1.15 »
1° marzo	»	»	. . . .	0.85 »
10 »	»	»	. . . .	0.40 »
30 »	»	»	. . . .	0.50 »
7 aprile (fecce liquide)	»	»	. . . .	2.25 »
20 aprile	»	»	. . . .	1.75 »
15 maggio	»	»	. . . .	2.00 »
2 giugno	»	»	. . . .	1.85 »
19 »	»	»	. . . .	1.00 »
2 luglio	»	»	. . . .	0.90 »

Autopsia.

Cellulare sottocutaneo asciutto con scarso pannicolo adiposo. *Muscoli* di colorito fosco ma sufficientemente conservati.

Cavo addominale. Peritoneo splendente, umido, di colorito normale. Assenza di liquido nel cavo peritoneale. — *Intestino* a contenuto diffluente, giallastro anche nelle ultime porzioni, con pareti di sufficiente spessore. La mucosa intestinale pallida per buon tratto della sua estensione si mostra ricoperta di uno strato di muco in discreta abbondanza; è iperemica nel primo tratto del digiuno, con qualche punto emorragico e qua e lá mostra qualche piccola ulcerazione. Al termine dell'ileo osservansi chiazze di colorito grigio-ardesiaco di varia dimensione, e in tutta la lunghezza dell'intestino le placche di Peyer mostransi tumefatte.

Stomaco, vuoto, modicamente dilatato, con pareti leggermente assottigliate. Superficie interna coperta da un denso strato di muco; mucosa cosparsa di piccole emorragie puntiformi, più addensate verso la regione pilorica.

Fegato congesto, senza speciali note degenerative, ingrossato.

Milza di colorito fosco, di volume poco più grande del normale, poco resistente al taglio, con trabecole connettivali appariscenti.

Reni: Capsula poco facilmente distaccabile; grandezza normale. Al taglio. sostanza corticale in buone condizioni; sostanza midollare congesta in massa, e in qualche punto emorragica.

Capsule surrenali con sostanza corticale di aspetto normale; sostanza midollare di colorito bruno-cioccolata, di aspetto gelatinoso.

Cavità pleuriche con scarsa quantitá di liquido sieroso limpido; pleura parietale e viscerale lucente, senza aderenze.

Pulmone: Ipostasi al lobo inferiore e a parte del lobo superiore destro; enfisema compensativo a sinistra.

Cuore con muscolatura ed apparecchi valvolari ben conservati; ventricolo destro pieno di coaguli nerastri; ventricolo sinistro vuoto.

Asse cerebro-spinale: Congeste e leggermente opacate le meningi; liquido abbondante negli spazi sotto-aracnoidei. Consistenza della sostanza cerebrale e del midollo spinale normale. In quest'ultimo al taglio protunde la sostanza grigia e si notano emorragie puntiformi sparse in quasi tutta la sua lunghezza.

All'esame microscopico degli organi interni trovasi:

Intestino: Mucosa edematosa, con epitelio in accentuata metaforfosi mucosa. Piccole emorragie sparse qua e là nella trama connettivale specie a livello del 1° tratto del digiuno. In qualche punto si osservano piccole ulcerazioni, di cui alcune in via di riparazione, interessanti la mucosa *in toto* e che si affondano anche nella sottomucosa. Placche di Peyer con cospicua infiltrazione peri- ed interfollicolare, senza traccia, però, di processi degenerativi. Sclerosi della sottomucosa con ispessimento delle tuniche muscolari dei vasi arteriosi che vi scorrono. Muscolare dell'intestino ben conservata. Colorazioni fatte su tagli col metodo di Weigert e col Nicolle mostrano la totale essenza di ogni infiltràzione batterica.

Stomaco: Mucosa sparsa di piccoli focolai emorragici. Muscolare normale.

Fegato, pancreas con lieve accenno di rigonfiamento torbido degli elementi specifici; le solite note di congestione sanguigna e i soliti piccoli focolai emorragici, sopratutto nel pancreas.

Rene: Dilatazione delle anse glomerulari, scarsa colorabilità dei nuclei

e loro scomparsa, con degenerazione granulosa o jalina del protoplasma delle cellule epiteliali dei tubuli contorti e della porzione discendente dell'ansa di Henle.

Capsule surrenali: Piccoli focolai emorragici e scarsa colorabilità con zone di degenerazione grassa degli elementi epiteliali della sostanza midollare. Sostanza corticale ben conservata.

Pulmoni: Dilatazione dei capillari; qualche emorragia nel connettivo di sostegno.

Sistema nervoso.

a) *Midollo spinale:* Nei preparati colorati col metodo Weigert-Breglia si notano piccole aree di degenerazione nel fascio fondamentale dei cordoni laterali (v. Tav. II, fig. I) solo in corrispondenza della porzione dorsale e lombare del midollo. La trama di fibre nervose che s'intersecano in tutti i sensi nella sostanza grigia della porzione cervicale del midollo, è quasi totalmente scomparsa nella porzione dorsale e lombare. In alcune sezioni della stessa porzione dorsale notasi una chiazza di sclerosi che smussa l'apice sinistro del cordone di Burdach estendendosi anche nella sostanza grigia della commissura posteriore.

Sezioni colorate con ematossilina e eosina lasciano vedere il canale centrale pervio, normale; piccole emorragie possono notarsi in tutta la lunghezza della sostanza grigia. In preparati allestiti col metodo Boccardi si notano le stesse alterazioni cellulari di cui ho fatto menzione nel primo cane, lesioni diffuse però ugualmente nelle varie porzioni del midollo, più abbondanti nelle cellule della colonna di Clarke e del nucleo di Stilling, di gran lunga minori fra le cellule ganglionari delle corna anteriori.

b) *Gangli spinali:* Cromatolisi, atrofia semplice e degenerazione jalina (Friedhrich) delle cellule ganglionari molto rilevante. Sclerosi del connettivo del ganglio non molto accentuata. In un preparato ho potuto osservare una cellula nervosa in stato di degenerazione ialina, con nucleo a bordi irregolari, ancora intensamente colorato: nel protoplasma della cellula si avanzano dalla periferia tre nuclei colorati meno intensamente del precedente e che possono essere interpetrati come appartenenti a cellule di sostegno che si avanzano strozzando la cellula nervosa ed invadendone il campo. Il fatto però che questa osservazione non si è ripetuta, e che invece è frequente il caso di vedere nicchie cellulari vuote del tutto, o riempite soltanto dei resti di cellule nervose cadute in isfacelo, in cui non si può osservare ancora alcun segno di attività proliferativa della trama di sostegno, ci fa ammettere come primitiva la lesione della cellula nervosa; il connettivo non verrebbe che in secondo tempo a proliferare e colmare gli spazi vuoti.

c) *Ganglio celiaco:* A differenza di ciò che si vede accadere nei gangli spinali, predominano qui sull'atrofia semplice degli elementi ganglionari i fatti di degenerazione ialina, o granulosa di tali elementi. Iperplasia connettivale, e sclerosi in vari punti del ganglio.

Cane III. — Peso kg. 7.300.

Tenuto dal 10 febbraio al 13 marzo a vitto ordinario, esaminati in questo periodo di tempo il succo gastrico e le urine trovo nel primo presenza di acido cloridrico e assenza di acidi organici; nelle seconde assenza di ogni principio patologico. Le fecce dure, figurate, di colore oscuro, hanno reazione

alcalina; il loro estratto acquoso provato sui conigli ha dato come indice di tossicità le seguenti cifre:

20 febbraio 1902 — Toss. estr. . . . . 1.00 %
12 marzo 1902 — Toss. estr. . . . . . . 0.95 %

Pesate varie volte le fecce emesse dall'animale nelle 24 ore, esse non hanno mai sorpassati gli 80 grammi. Il 13 marzo 1902 il cane che a questo momento pesava kg. 7.500 viene messo a polenta (400 gr. di farina di mais condita con sugna e bollita in acqua). Esso mangia volentieri il suo pasto, ma ne risente ben presto gli effetti dannosi, tanto che dopo un mese e mezzo circa di questo trattamento, il 29 aprile, pesava kg. 7.200. Le fecce solide e scolorate, diventate di reazione acida sin dai primi giorni da che ebbe principio l'esperienza, aumentano di volume, raggiungendo qualche volta nelle 24 ore il peso di 190 grammi. Esaminate al microscopio si nota qualche granulo di amido di mais ben conservato.

A partire però da questo momento, quantunque durasse immutato il trattamento, il cane sembra rapidamente rimettersi. Pesato il 10 maggio esso era di kg. 7.600 e il 20 dello stesso mese raggiungeva gli otto chilogrammi. Le fecce sempre dure, poco colorate e voluminose, vengono emesse giornalmente, e al microscopio o non si rivela più la presenza di amido, o si rivela raramente. Così si va avanti per quatto mesi di seguito, durante i quali il cane, con trascurabili oscillazioni in più o in meno, mantiene il suo peso di otto chilogrammi. Comincia soltanto in agosto a manifestarsi un poco di stitichezza, ma non si mantiene che per pochi giorni. Ritorna in settembre e d'allora in poi comincia a diventare stabile; solo il 20 ottobre ha un accesso di diarrea che non si ripete più per tutto il rimanente tempo di vita dell'animale.

Per la prima volta, dopo questo accennato periodo di sosta, il cane il giorno 11 di settembre, pesato, tocca i kg. 7.800 e s'inizia un sintoma non veduto nei due cani di cui ho precedentemente riferita la storia: la caduta dei peli dalla coda.

Il 2 ottobre per la prima volta il cane dopo forti contrazioni del diaframma, vomita emettendo un liquido schiumoso, poco abbondante. Ed è questo un sintoma che permane, assieme ad una ostinata stitichezza; quasi giornalmente il vomito si ripete, in seguito a prolungate, spasmodiche, accessionali contratture del diaframma. E allorchè queste intervengono l'animale guaisce, è irrequieto, si poggia tal volta sulle zampe allargate, si siede tal'altra appoggiandosi con un fianco ad un muro. Nei giorni di sosta di questo tale sintoma, mostra fisonomia abbattuta, si muove svogliatamente; allarga le gambe quando è obbligato a camminare; trema per tutto il corpo anche quando si ferma, e stando in questa posizione solleva continuamente e alternativamente le zampe anteriori dal suolo come se qualche cosa gli bruciasse sotto i piedi. Non vi ha asimmetria nelle pupille; entrambe sono leggermente miotiche, ma reagiscono bene alla luce. La mucosa geniena è arida, fortemente pigmentata in bruno. Le fecce sono scarse, solide, sempre acide, e al microscopio mostrano abbondantissimi granuli di amido. Il 26 novembre, quantunque non fosse gran fatto diminuito di peso (kg. 6.400), il cane non può più reggersi sulle gambe; dandogli però un po' di tregua il vomito, mangia per intero il suo pasto.

Ritirato il contenuto gastrico due ore dopo il pasto, trovo: reazione acida; acido cloridrico assente; abbondanti gli acidi organici; muco in quantità rilevantissima. Dura ancora per pochi altri giorni in queste condizioni, finchè l'otto dicembre dopo nove mesi di trattamento cessa di vivere. L'ultima pesata dell'animale fatta il 6 dicembre aveva dato kg. 6. 100.

Il dosaggio della tossicità dell'estratto delle fecce durante tutto il periodo di alimentazione a mais ha dato:

30 marzo 1902 —	Tossicità	estratto	. . . . 1. 95 %
7 aprile 1902 —	Id.	id.	. . . . 2. 50 %
30 aprile 1902 —	Id.	id.	. . . . 0. 75 %
30 maggio 1902 —	Id.	id.	. . . . 1. 00 %
20 giugno 1902 —	Id.	id.	. . . . 1. 35 %
2 luglio 1902 —	Id.	id.	. . . . 1. 00 %
30 agosto 1902 —	Id.	id.	. . . . 1. 15 %
15 settembre 1902 —	Id.	id.	. . . . 0. 90 %
7 ottobre 1902 —	Id.	id.	. . . . 0. 60 %
10 novembre 1092 —	Id.	id.	. . . . 0. 75 %
1 dicembre 1902 —	Id.	id.	. . . . 0. 35 %

L'analisi dell'urina praticata il 12 novembre mostra presenza di albumina (1/2 ‰), presenza di acetone (met. di Legal) e di piccole quantità di zucchero diabetico.

Autopsia. — Pannicolo adiposo scarso; muscoli brunastri, e un poco atrofici.

Cavo peritoneale asciutto; epiploon con grasso in buona quantità; pacchetto intestinale e stomaco con stasi cospicua; quest'ultimo è modicamente dilatato, ed ha la mucosa assottigliata in ispecie fra le pliche.

Mucosa intestinale fortemente iperemica e chiazze ulcerose, a fondo lardaceo, di varia dimensione (v. Tav. VII, fig. 1) e sparse qua e là, sopratutto nel digiuno.

Pancreas con chiazze emorragiche disseminate.

Milza un poco impicciolita; la diminuzione di volume è fatta sopratutto a spese della polpa.

Fegato. — La massa dell'organo mostra i segni di una iperemia flussionale attiva. Nessun fatto degenerativo. Cistifellea piena di bile, fluida, scorrevole.

Polmoni. — Forte ipostasi al pulmone sinistro; enfisema vicariante a destra.

Cuore. — Muscolatura ben conservata; apparecchi valvolari integri. Il ventricolo destro è pieno di grumi nerastri.

Asse cerebro-spinale. — Meningi fortemente congeste, e in qualche punto opacate. Pia meninge cerebrale difficilmente distaccabile dall'organo sottostante. Midollo spinale con emorragie puntiformi disseminate in tutta la sostanza grigia della porzione dorsale e lombare.

Rene impicciolito, note di nefrite cronica interstiziale.

Capsule surrenali. — Sostanza corticale ben conservata; sostanza midollare gelatinosa, brunastra.

L'esame microscopico dei vari organi ha fatto rilevare:

Intestino. — Sparso, come al solito, specie nella prima porzione del di-

giuno di focolai emorragici molto frequenti ma che non raggiungono mai imponenti dimensioni. L'epitelio che mostra una molto cospicua metamorfosi mucosa è in molti punti sfaldato, lasciando così a nudo la parte connettivale dei villi, i cui vasi sono in stato di cospicua dilatazione.

Fatti distruttivi si accennano in vari punti della mucosa: non raramente si possono osservare perdite di sostanza, vere ulcerazioni, di cui qualcuna in via di riparazione, interessanti tutto quanto lo spessore della mucosa (v. Tav. VII, fig. 2). Le placche di Peyer sono tumefatte, con infiltrazione parvi-cellulare peri- ed interfollicolare; l'infiltrazione linfoide si spinge anche nei villi. Mai, però, nè nei punti con semplici perdite epiteliali, nè a livello delle placche di Peyer tumefatte, e neanche attorno alle ulcerazioni della mucosa; mai, dico, ho potuto notare con le colorazioni al Weigert ed al Nicolle, infiltrazione batterica dei tessuti circostanti al punto leso.

La sottomucosa è sclerosata; le tuniche muscolari ben conservate.

Stomaco. — Le solite piccole emorragie della mucosa specie in corrispondenza del suo tratto pilorico.

Gli elementi epiteliali ghiandolari non si mostrano alterati.

Pancreas. — I lobuli dell'organo sono perfettamente conservati; tutte le alterazioni si limitano a quelle parti del pancreas cui è stata attribuita una importanza speciale per la produzione del fermento glicolitico pancreatico, cioè ai corpuscoli di Langerans. Frequentissime in seno a tali corpuscoli le emorragie capillari, e non è raro vedere i nuclei impalliditi, e la massa protoplasmatica che li contiene in degenerazione granulosa (v. Tav. VII, fig. 3).

Fegato. — Dilatazione dei vasi inter- ed intralobulari. Nessuna nota degenerativa.

Rene. — Fra gli organi interni, se si fa astrazione del sistema nervoso, è quello che più di tutti mostra aver risentito di una azione tossica cospicua e cronica (v. Tav. VII, fig. 4). Talora sono le anse vascolari dei glomeruli malpighiani, che cospicuamente dilatate, si sono rotte in qualche punto lasciando fuoriuscire nella capsula del glomerulo il loro contenuto ematico; tal'altra è l'epitelio capsulare e glomerulare che mostrasi desquamato o anche proliferato, e che ingombra la capsula misto ad essudato fibrinoso in degenerazione ialina. In altri punti sono gli epiteli dei canalicoli che si mostrano in via di desquamazione o intorbidati, con nuclei poco colorabili o anche in stato di completa cariolisi.

Capsule surrenali. — Oltre una cospicua dilatazione e replezione sanguigna dei capillari e delle piccole vene, oltre i soliti piccoli focolai emorragici già notati nei reperti precedenti, è notevole uno stato di necrobiosi uniformemente diffuso a gran parte degli elementi cellulari della sostanza midollare. Le cellule hanno nuclei che o si non colorano affatto, o si colorano poco; il loro corpo protoplasmatico d'ordinario non assume il colorito rosso dell'eosina (preparati allestiti con colorazione doppia ematossilina ed eosina), e molto frequentemente mostrasi anche in parte o completamente disgregato. Anche in questo caso, come nei precedenti cani, si hanno note di degenerazione grassa diffuse in vari punti della sostanza midollare, e al limite tra questa sostanza e la corticale.

Polmoni. — Note di emorragia da stasi; nessun fatto infiammatorio. Epitelio di rivestimento degli alveoli del tutto normale.

Sistema nervoso:

a) *Midollo spinale.* — Cromatolisi di gran numero delle cellule ganglionari alla base delle corna posteriori della sostanza grigia. Parecchie di esse sono in stato di degenerazione vacuolare (v. Tav. VIII, fig. 2): il corpo protoplasmatico, sformato, retratto, lascia libero attorno a sè uno spazio in cui non ho mai notato cenno di proliferazione delle cellule stellate. Il nucleo, nelle cellule ganglionari lese, d'ordinario ancora con un contorno netto che spicca nella massa omogeneizzata (degenerazione ialina) o vacuolata del protoplasma, mostrasi qualche volta eccentrico, ed anche ranggrinzato, qualche altra volta totalmente scomparso. Resta in questi casi al posto della cellula un residuo granuloso, amorfo, in cui si indovina la preesistenza della cellula nervosa degenerata. Manca però negli elementi specifici ogni traccia di degenerazione pigmentaria. I prolungamenti protoplasmatici sono spesso rigonfiati, varicosi. Nei preparati colorati con ematossilina ed eosina si nota il canale centrale pervio in tutta quanta la sua lunghezza, e rivestito come d'ordinario dalle sue cellule epiteliali. Emorragie puntiformi sono sparse uniformemente e frequentemente in tutta la lunghezza del midollo, più nella sostanza bianca che nella grigia; sono però emorragie recenti, senza tracce di organizzazione. Nei preparati colorati col metodo Weigert-Breglia, oltre qualche piccola chiazza di degenerazione nei fasci fondamentali dei cordoni laterali, a livello della sezione dorsale del midollo non si osserva poi niente altro di patologico: i fasci piramidali cruciati, su cui, tenuto conto dei reperti anatomo-patologici dei pellagrosi, ho sempre fissato la mia attenzione, sono perfettamente normali, in tutta quanta la loro estensione.

b) *Gangli spinali.* — Gli è nei gangli corrispondenti alla parte dorsale e lombare del midollo spinale che sono visibili le alterazioni di cui vado a tenor parola. Si vedono in genere note uniformemente diffuse di atrofia semplice degli elementi nervosi; alcune cellule sono invase nella loro sostanza protoplasmatica da fini granuli nerastri (degenerazione pigmentaria) abbondanti tanto da riempire tutto il corpo cellulare mascherando anche il nucleo. Altre cellule hanno il protoplasma completamente omogeneizzato, ialino (v. Tav. VIII, fig. 4); altre infine, scomparso il nucleo, sono raggrinzate o completamente disfatte in una massa granulosa, amorfa. Mancano le note di degenerazione vacuolare notate nelle cellule ganglionari del midollo.

c) *Ganglio celiaco.* — Atrofia quasi completa degli elementi nervosi; sclerosi cospicua del ganglio (v. Tav. VIII, fig. 5).

Cane IV. — Peso kg. 9.200. Dal 20 febbraio 1902 al 12 marzo successivo l'animale è alimentato a maccheroni (400 gm.). Il suo peso va gradatamente aumentando fino a raggiungere, il 12 marzo, kg. 9.500. L'analisi dell'urina praticata in questo giorno mostra la totale assenza di ogni principio patologico; l'esame del contenuto gastrico ritirato nella stessa giornata 3 ore dopo il pasto fa riscontrare la presenza di acido cloridrico, e la totale assenza di acidi organici. Le fecce emesse in questo primo periodo hanno reazione alcalina, sono dure, brunastre; la loro quantità media nelle 24 ore è di gm. 95 e l'estratto acquoso saggiato su conigli, col solito metodo dell'iniezione endovenosa, in due periodi differenti ha dato le seguenti cifre:

20 febbraio 1902.	Toss. estratto	. .	1.65 °/₀
12 marzo	» »	. . .	1.80 °/₀

Il 12 marzo comincio ad alimentare il cane con sola polenta (400 gm. di farina), pasto ingerito con piacere dall'animale, il quale, però, comincia a dimostrarne ben presto i tristi effetti. In meno di un mese esso perde di mezzo chilogrammo in peso (7 aprile kg. 9). Aumenta considerevolmente la quantità giornaliera delle fecce (190-200 grammi nelle 24 ore). Si conservano queste ancora dure, figurate, ma sono pallide, di reazione acida, e mostrano al microscopio una discreta quantità di granuli di amido. La tossicità dell'estratto che in primo tempo si mostra diminuita va ben presto (10 aprile) a raggiungere la cifra di 1.40 per cento e il 12 maggio si ha la prima fugace comparsa della diarrea. Il cane emette una grande quantità di materiale fecale gialletto, sieroso, che ha tutto l'aspetto di polenta stemperata in acqua ed in cui il microscopio da un lato, e la reazione chimica dall'altro mostrano la grande quantità di amido ivi esistente. È questo però un disturbo che non si mantiene; le fecce tornano a farsi solide, diminuisce in esse l'amido fino quasi a scomparire del tutto; il cane riguadagna in peso e va ancora oltre il peso primitivo (15 giungo kg. 9.600). Negli ultimi giorni di luglio comincia ad avere un po' di abbattimento, diminuisce di peso (28 luglio kg. 9.400) e il 1° agosto ha un nuovo accesso di diarrea che anche questa volta scomparisce ben presto per cedere il passo ad una ostinata stitichezza. Ripiglia ancora una volta il suo peso (26 settembre kg. 9.600) e va avanti ingrossando fino al 14 ottobre in cui raggiunge i kg. 10.400. Da questo momento, in cui l'animale ha raggiunto l'apice del tratto ascendente della parabola, comincia, e questa volta per mantenersi, a percorrerne il tratto discendente. Il 20 ottobre torna la diarrea, con i soliti caratteri, e ad essa, a breve intervallo di tempo, succede il primo accesso di vomito, a carattere alimentare. Raccolgo questo materiale appena emesso, lo diluisco con poca acqua distillata, filtro, ed il filtrato non fa mutare di colore la soluzione di metil violetto (assenza di acido cloridrico), mentre muta nettamente in gialletto la colorazione ametista del reattivo di Uffelmann (presenza di acidi organici). Torna ancora il vomito per atlre tre volte, l'ultima delle quali (8 novembre) perduto il primitivo carattere alimentare, si mostra mucoso. L'insieme di questi sintomi gastro-enterici è preceduto da un altro sintoma che ho già notato nel cane precedente: il 2 ottobre mi accorgo che il cane comincia a perdere i peli dalla coda. La diarrea cessa, il vomito cessa; ma la coda continua a spelarsi e progredisce con essa la diminuzione del peso del corpo. Questo cane che il 10 ottobre pesava kg. 10.400 il 2 gennaio 1903 pesava kg. 8.900. Esso, mantenendosi sempre voracissimo, il 7 gennaio rifiuta per la prima volta una parte del cibo. Perduta la abituale vivacità, se ne sta volentieri accoccolato, ed anche se riposa al sole si vede spesso il suo corpo agitato da un tremore diffuso.

La deambulazione si compie senza stento, ma l'animale si muove sempre suo malgrado. I peli prima lisci, lucenti, sono ora — in corrispondenza della parte dorsale-posteriore del corpo — eretti, disordinati, privi di lucentezza e con quell'aspetto impolverato che è proprio dei capelli dei tignosi. Inoltre alle due gambe di sinistra ha due chiazze eczematose di cui quella della zampa anteriore raggiunge la grandezza di una moneta da 10 centesimi.

L'analisi dell'urina praticata il 28 dicembre mostra presenza di albumina (piccole quantità) e di acetone. Scende rapidamente di peso l'animale nel mese di gennaio (7800 gr.) e il 20 di questo mese noto un principio di

pigmentazione brunastra della mucosa gengivale in corrispondenza dell'ar. cata alveolare destra. La diarrea non si ha più, ma le fecce continuano ad aumentare di tossicità, e contemporaneamente progredisce lo stato di generale marasma dell'animale il quale nella seconda quindicina di febbraio non raggiunge più che kg. 6. 300.

Perdurano le due chiazze di eczema ai due arti di sinistra, e la zampa anteriore mostrasi anche un poco elefantiastica. A questo punto — non potendo per mie particolari ragioni tenerlo ancora in esperimento — sacrifico il cane.

All'autopsia si nota:

Cellulare sottocutaneo con scarso pannicolo adiposo.

Muscoli di colorito roseo, succulenti, discretamente conservati.

Cavo addominale privo di liquido; il peritoneo parietale e viscerale è umido e splendente. L'epiploon mantiene ancora una piccola quantità di adipe.

Stomaco con scarso materiale mucoso, tendente al verdastro che copre uniformemente la mucosa. Questa è iperemica, con piccole emorragie uniformemente diffuse in tutta la sua estensione, di spessore normale. Muscolatura in ottimo stato; lo stomaco non è dilatato.

Intestino. — Contiene un materiale quasi solido nelle ultime porzioni; è spalmato di abbondante muco nella sua parte iniziale. Le pareti sono sufficientemente spesse; la mucosa iperemica, mostra considerevoli chiazze emorragiche nel tratto duodenale e nel digiuno. Le placche di Peyer sono modicamente tumefatte; non si hanno perdite di sostanze visibili ad occhio nudo, nè tracce di ulcerazioni riparate.

Milza. — Pallida, un po' impicciolita per una modica atrofia della polpa.

Fegato. — Di apparenza e di consistenza normale.

Reni. — Di volume normale; si nota una certa difficoltà allo scollamento della capsula e al taglio si hanno le note di una palese nefrite cronica interstiziale.

Capsule surrenali. — Un po' ingrandite. Al taglio si mostra assottigliata la porzione corticale; la porzione midollare che al centro conserva ancora il suo aspetto fisiologico, mostra invece una zona periferica, di colorito fosco, brunastro e di aspetto gelatinoso in mezzo a cui spiccano dei punti gialletti, poco estesi.

Pancreas. — Iperemico e sparso di piccole emorragie puntiformi.

Pulmoni - Cuore. — Di aspetto e consistenza normali.

Asse cerebro-spinale. — Iperemia delle meningi; scarso il liquido cefalorachidiano. Il midollo spinale di consistenza normale, mostra al taglio dei piccoli punti emorragici solo nella sostanza grigia della sua porzione dorsale.

Le temperature rettali prese negli animali studiati a differente periodo del trattamento non hanno fatto mai rilevare periodi notevoli di ipertermia.

***

Ecco dunque una malattia dei cani, e malattia mortale, ingenerata in essi dalla alimentazione maidica esclusiva e con mais sano, e che dal punto di vista clinico si può ben così riassumere: Ente rite cronica talvolta semplicemente catarrale mucosa, tal'altra anche emorragica, accompagnata da disturbi essenziali della funzione gastrica (acloridria). Gli animali che si mostrano voraci sino all'ultimo, dimagriscono, vomitano, hanno stitichezza o anche diarrea; nell'uno o nell'altro caso la quantità di fecce emesse è sempre abbondante. Comparisce poi l'albuminuria, e l'acetonuria. Perdono quindi i peli, specie quelli della coda, mostrano qualche chiazza di eczema secco; la bocca si fa asciutta, la mucosa si pigmenta. le pupille si fanno miotiche, interviene una profonda astenia, l'andatura si fa incerta, barcollante, la fisonomia perde ogni espressione di vivacità, e l'animale muore.

Dal punto di vista anatomo-patologico le lesioni riscontrate si possono riassumere in alterazioni degenerative e perdite di sostanza della mucosa intestinale, nefrite parenchimale, o glomerulo-nefrite, con note anche di nefrite interstiziale cronica; necrobiosi diffusa a tutta la sostanza midollare della capsula surrenale con accenni di degenerazione grassa, quasi sistematicamente limitata alla zona di contatto tra la sostanza midollare e la corticale; alterazione del pancreas limitata in massima ai corpuscoli di Langerans; alterazioni cellulari degenerative del midollo spinale, con qualche accenno di sclerosi dei fasci; degenerazione ed atrofia degli elementi ganglionari, e sclerosi successiva del celiaco e dei gangli infravertebrali dorsali e lombari.

Vi ha come si vede in tale malattia una sindrome sintomatologica e un insieme di lesioni anatomo-patologiche che potrebbero anche essere non troppo arbitrariamente paragonate ai fatti clinici e alle lesioni anatomiche riscontrate nell'uomo pellagroso.

Diarrea o stitichezza; bocca arida, lingua patinosa e screpolata, acloridria del succo gastrico e conseguenti rutti, pirosi, vomiti a vario carattere; celialgie ricorrenti; albuminuria e acetonuria; eritemi cutanei; inattitudine al lavoro per un senso di profonda astenia, disturbi del movimento, disturbi psichici; ecco in breve il quadro della pellagra nell'uomo. Ed ecco anche — astrazion fatta dei disturbi nervosi, malamente rilevabili sugli animali — ecco anche il *quadro sintomatologico* a cui dà luogo nei cani la esclusiva alimentazione maidica.

E vengo ai dati fornitici dallo *studio anatomo-patologico degli organi interni*. Così alle notate lesioni del pancreas e delle capsule surrenali dei cani in esame, fa perfetto riscontro l'osservazione del D'Ormea, il quale già al taglio, e poi con la prova delle citoprecipitine, constatava la cospicua alterazione di questi due organi nei pellagrosi.

Io ho notato nei cani ed ho fatto disegnare, delle lesioni del celiaco e dei gangli infravertebrali di cui non si può non riconoscere l'identità con quelle che Brugia e Babes hanno rispettivamente descritto e figurato nei gangli celiaco e infravertebrali degli uomini morti di pellagra.

Ora, se potessimo fermarci a questo punto nel parallelo stabilito, le conclusioni che se ne potrebbero detrarre non ci lascerebbero per nulla in dubbio. Vi sono però delle differenze, e dirò anche delle differenze cospicue, in ciò che riguarda la natura delle lesioni dell'asse nervoso spinale e anche la loro topografia. Il Belmondo nel suo studio accurato sulle lesioni nervose in 20 pazzi pellagrosi, parla di degenerazione dei fasci piramidali cruciati, degenerazione a cui connette la esagerazione del riflesso rotuleo, e i disturbi dell'andatura notati in tale specie di malattia. Qualche volta egli trova anche focolai di sclerosi, o di degenerazione nei cordoni posteriori, e nota ancora fatti non molto accentuati di atrofia delle cellule ganglionari della porzione dorsale e lombare del midollo. Nei miei cani invece niente di tutto questo. I fasci motori e sensitivi spinali in genere sono ben conservati; ho visto è vero nel 1° cane delle piccole chiazze di degenerazione nei fasci fondamentali dei cordoni laterali; ho rilevato ancora nel 2° cane la sclerosi unilaterale, molto circoscritta, dell'apice del cordone di Burdach di sinistra; ma sono queste delle osservazioni che non si sono mai ripetute negli altri cani e di cui non si può quindi tenere gran conto. Tutte le lesioni del midollo spinale in questi, a differenza di quello che si vede accadere nell'uomo, sono puramente cellulari. Ma si può per questa particolare dissomiglianza di reperto, respingere l'idea che esista un molto intimo legame fra questa malattia dei cani e la pellagra dell'uomo? Io sarei tentato di non crederlo. Non bisogna, a mio parere, trascurare in tale disamina il fatto che allo stesso agente patogeno non tutti gli animali reagiscono alla stessa maniera. Esistono spesso sostanziali differenze nella forma clinica e nel reperto anatomo-patologico di due individui della stessa specie ammalati di malattia etiologicamente identica; e perchè dovrebbe essere allora impossibile ammettere come determinata da un agente unico una malattia

che in due animali di specie differente dà luogo a qualche differenza di reperto? Io naturalmente non ho la pretesa di risolvere il problema in base alle scarse esperienze che ho potuto sino ad ora praticare, onde lascio la interrogazione come tale e passo a riferire le mie ricerche intese a stabilire la causa di questa malattia sperimentale dei cani.

***

Quantunque il genere di alimentazione a cui i cani che ho tenuti in esperimento sono stati sottoposti, e la notata analogia tra la loro malattia sperimentale e la pellagra dell'uomo, mi desse il diritto di parlarne, io tuttavia, per amore di brevità, tralascerò di discutere sulla importanza delle opinioni da vari e valenti pellagrologi emesse per stabilire la etiologia della pellagra. Io non risalirò nè al *verderame* di Ballardini, nè al *b. maidis* di Maiocchi o di Carraroli; non mi occuperò della *pellagrozeina* di Lombroso, nè della teoria della *insufficienza alimentare* di Lussana ripresa a sostenere in questi ultimi tempi da Hameau, Hillairèt, Gaucher, Sergent della scuola di Bouchard.

Sarà soltanto mia cura esporre quali sono state le indagini da me eseguite per spiegare in che cosa bisogna ricercare l'agente morboso che determina la notata malattia dei cani, e di trarne possibilmente delle conclusioni che solo con ulteriori studi potranno forse essere applicate alla spiegazione della etiologia della pellagra nell'uomo.

È bene innanzi tutto che io mi sbarazzi il campo da una prima ipotesi: *Questa pellagra dei cani è da ascriversi fra le infezioni microbiche?* Primi a comparire sono nella alimentazione maidica i disturbi intestinali; l'intestino dovrebbe quindi essere la parte più indiziata dell'organismo come punto di partenza di una eventuale infezione generalizzata. Ma i batteri non passano attraverso la mucosa: sana, o privata del suo epitelio, ulcerata anche, essa col suo epitelio prima, con i suoi elementi mesenchimali poi, oppone ai germi una insormontabile barriera, e ne fanno fede i numerosi preparati allestiti dall'intestino dei vari cani e in cui non ho mai notato tracce d'infiltrazione batterica fra i tessuti della mucosa. Potevano però — analogamente a quello che si ha nel tifo — i sintomi intestinali essere l'esponente di una infezione generalizzata dell'organismo. Ma i preparati fatti dai vari organi non mi hanno mai fatto vedere batteri nella loro compage, e le prove culturali sono rimaste sempre sterili. Vi è un fatto invece che merita ogni attenzione: Indice dello stato

di salute degli animali è certamente il loro peso; ed è facile constatare, per chi guarda alle annesse grafiche, come vi sia un parallelismo perfetto fra le oscillazioni del loro peso e quello della tossicità delle fecce. L'indagine quindi sulle cause della modificazione del peso di questi animali in esperimento — ciò che è quanto dire sulle cause che influenzano la loro salute — si riduce ad una indagine sulle cause che determinano l'aumento di tossicità delle loro fecce.

***

A questo scopo — tenendo conto della indiscutibile influenza che i microrganismi dell'intestino esercitano sui processi della digestione degli alimenti — ho voluto innanzi tutto vedere *se vi hanno differenze cospicue tra la flora microbica intestinale dei cani sani tenuti a vitto ordinario e tra quella dei cani tenuti a sola polenta.* E delle differenze veramente si hanno.

In otto cani alimentati giornalmente con pane o maccheroni, in diversi periodi di tempo, a mezzo di una robusta ansa di platino ho prelevato dal bolo fecale di recente emesso una piccola quantità di fecce che stemperavo in una certa quantitá di acqua sterile (10 cmc.) già pesata alla bilancia di precisione. Tornavo a pesare dopo la immissione in essa del materiale fecale, e la differenza tra la prima e la seconda pesata mi dava il quantitativo di fecce stemperatovi. Prelevando poi da questa miscela quantitá misurate di liquido ne facevo scatole in gelatina alcalina e in agar acido glucosato. Contate le colonie sviluppatesi dopo 4 giorni (temp. 21° C.) ho avuto i seguenti risultati:

TABELLA I.

	B. coli	Specie fondenti	Muffe	Blastomiceti
1° cane	14,740,000	0	0	0
2° cane	7,890,000	0	18,000	0
3° cane	11,400,000	2,400	7,900	0
4° cane	20,150,000	0	12,000	2,400
5° cane	4,145,000	0	0	0
6° cane	10,940,000	1,200	9,200	0
7° cane	19.260,000	0	0	0
8° cane	9,875,000	0	9,250	0

Se ne può dedurre quindi che specie costante e assolutamente predominante è, nell'intestino del cane sano, il b. coli; si possono avere anche delle muffe, le quali, aggiungerò, sono quasi sempre delle penicilliacee, e qualche volta a questi due rappresentanti della flora intestinale si aggiungono in modestissime proporzioni le specie fondenti ed i blastomiceti. In 4 di essi poi (il 5°, 6°, 7° e 8° cane sono i 4 cani di cui ho in principio del lavoro esposte le storie cliniche) sostituisco l'alimentazione a maccheroni con l'alimentazione a mais e esaminandone le fecce in epoche differenti — adottando la stessa tecnica descritta per le 8 esperienze anzidette — ho avuto in media i seguenti risultati:

Tabella II.

	B. coli	Specie fondenti	Muffe	Blastomiceti
1° cane	45,070,000	0	45,000	1,200,000
2° cane	60,540,000	1,600	8,100	98,000
3° cane	52,700,000	0	900	900,700
4° cane	38,900	0	1,400	1,450,000

Come si vede, tanto nel primo caso, in cani cioè ad alimentazione ordinaria, quanto nel secondo, in cani ad alimentazione maidica, rappresentante principale della flora batterica intestinale è il b. coli. Forma quasi assoluta e costante in tutti i cani, esso si associa in quelli ad alimentazione maidica ad un numero più o meno cospicuo (1) di blastomiceti e di muffe; si ha è vero qualche volta la comparsa di specie fondenti la gelatina, ma sono esse tanto poco costanti che io mi sono creduto in diritto di trascurarne lo studio e di limitare invece le mie ricerche all'ufficio eventuale che il b. coli in primo luogo, i blastomiceti e le muffe danno in questa notata esagerazione di tossicità delle fecce maidiche, e quindi nello scadimento della salute dei relativi animali.

(1) Bisogna tener conto che le cifre segnate nella tabella II sono le risultanti di una media aritmetica di quelle ottenute in conte differenti in cui, naturalmente, alcune volte si sono avute cifre molto più elevate, altre volte più basse delle segnate.

a) *Azione del B. coli.*

È stata innanzi tutto mia cura di esaminare se non fosse il caso di distinguere razze diverse di b. coli fra tutta la enorme congerie dei germi di questa specie alberganti nell'intestino di ogni singolo individuo.

Nè parrà strana la ricerca quando si pensi alla multiforme attività biologica di questo germe che va sempre più mettendosi in luce, ed alla speciale attitudine sua di modificarsi a secondo dell'ambiente che trova, cosa che faceva parlare di recente Escherich di una *coli-razza personale*. A tale scopo dalle fecce dei quattro cani in esame, e da quelle di quattro uomini adulti, praticato l'isolamento in agar su scatole di Petri, ho fatto il trapianto in brodo di quattro colonie di b. coli scelte a caso in ognuno degli isolamenti, e di ciascuno di questi campioni così ottenuto ho esaminato la grandezza, la mobilità, il potere di produzione dell'indolo, il potere di wacidificazione del brodo nutritivo, l'agglutinabilità con siero specifico, e la resistenza all'azione batteriolitica del siero di sangue normale. Riassumo nella tabella seguente i risultati avuti:

TABELLA III.

B. COLI	1° cane				2° cane				3° cane				4° cane			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Dimensioni (μ)	3	2	3	3	3	3	3	3	2	4	4	3	4	4	4	4
Mobilità	debole	debole	mediocre	debole	mediocre	mediocre	mediocre	mediocre	forte	mediocre	forte	forte	forte	forte	forte	forte
Reazione dell'indolo . .	intensa	intensa	intensa	intensa	debole	debolissima	debole	debole	debole	mediocre	mediocre	debole	intensa	intensa	intensa	intensa
Limite massimo di agglutinabilità.	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1200}$	$\frac{1}{1100}$	$\frac{1}{1200}$	$\frac{1}{1200}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{900}$	$\frac{1}{900}$	$\frac{1}{900}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{300}$
Numero dei germi distrutti da 1 cmc. di siero di coniglio nuovo.	250	310	225	200	300	150	315	287	480	470	415	450	195	215	200	250
Cmc. di brodo-cultura corrispondenti a 0.0143 di acido ossalico.	15	14.5	15.6	15	20.5	19	20.8	20	23	23	23	22.5	19	19.5	19	19.2

NB. Il brodo nutritivo adoperato per lo studio dei vari campioni di ogni isolamento era preso dalla stessa massa e distribuito in provette a parità di volume (10 cmc). Le prove dell'indolo sono fatte in culture di 3 giorni, e con dosi uguali, s'intende, di nitrito potassico o di acido solforico.

Segue TABELLA III.

B. COLI	1° uomo				2° uomo				3° uomo				4° uomo			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Dimensioni (μ)	2	2	3	2	4	5	5	5	2	3	3	3	3	3	3	3
Mobilità	mediocre	mediocre	mediocre	debole	debole	debole	debole	debole	fortissima	fortissima	forte	fortissima	mediocre	mediocre	mediocre	mediocre
Reazione dell'indolo . .	intensa	intensa	intensa	intensa	mediocre	forte	mediocre	mediocre	debole	debole	debole	debole	debole	debole	debole	debole
Limite massimo di agglutinabilità.	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{900}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{1700}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{800}$
Numero dei germi distrutti da 1 cmc. di siero di coniglio nuovo.	510	480	180	550	400	320	300	350	300	350	275	290	415	360	400	420
Cmc. di brodo-cultura corrispondenti a 0.0143 di acido ossalico.	20	19	19.5	20	30	30	29	26.5	17	16.8	17	17	25	24.9	24.5	25.2

NB. Il brodo nutritivo adoperato per lo studio dei vari campioni di ogni isolamento era preso dalla stessa massa e distribuito in provette a parità di volume (10 cmc.). Le prove dell'indolo sono fatte in culture di 3 giorni, e con dosi uguali, s'intende, di nitrito potassico e di acido solforico.

Si hanno come si vede nei campioni di b. coli dello stesso gruppo differenze di comportamento o nulle, o tanto poco accentuate da essere addirittura trascurabili. È certo, e chi ha pratica di laboratorio lo sa purtroppo, che in materia di b. coli si può dire che quella varietà ottenuta da un isolamento, non rassomiglia mai perfettamente a quella ottenuta in un isolamento fatto da altro mezzo in esame: alcuni danno la reazione dell'indolo, altri non la danno, o la danno tardi e debolissima; vi è fra essi chi coagula il latte in 48 ore e chi non lo coagula affatto pur impartendo ad esso un modico grado di acidità; certe varietà si mostrano con elementi piccoli aventi un leggiero movimento di trepidazione, mentre in altre si possono scorgere dei veri filamenti dotati di un movimento serpentino di traslazione analogo a quello del tifo. Ma è certo altresì che tutte queste varietà, e lo dimostrano le osservazioni che ho sopra riassunte, è certo dico che esse se trovando il succo gastrico in periodo di digestione, in uno stato cioè di criptocloridria, arrivano a pervenire nell'intestino, trovandosi uniti a dover vivere in un ambiente uniforme per tutti, vi si adattano, si modificano, smussano, dirò così, le loro differenze e acquistano tali caratteri di uniformità per cui non è più possibile distinguere l'una varietà dall'altra. Gli è in base a questa constatazione di fatto che io mi sono contentato di eseguire le ricerche che vado a riferire non su differenti campioni di b. coli isolati dallo stesso individuo, ma su singoli campioni isolati dalle fecce di singoli individui.

Ho preso quindi in esame due b. coli di due uomini adulti e due b. coli provenienti dalle fecce di due cani ed ho cercato se vi ha differenza nel potere biologico di questi germi allorchè essi vengono coltivati in brodo nutritivo e in decozione di mais (1). E la differenza veramente esiste ed è fondamentale: adoperando culture di 48 ore (37° C.) fatte in quantità uguali di brodo nutritivo e di decozione di mais, in questo terreno costantemente si esagera la virulenza del germe e la tossicità delle sue culture.

---

(1) La decozione di mais viene allestita mescolando 100 gr. di farina di mais a 500 gr. di acqua e portando il tutto per un quarto d'ora alla stufa di Koch. Filtro quindi attraverso un panno di tela, e adopero il liquido ottenuto (convenientemente sterilizzato) come terreno di nutrizione.

TABELLA IV.

	Virulenza		Tossicità		Annotazione
	Culture in brodo	Culture in mais	Culture in brodo	Culture in mais	
B. coli I . . .	0.45 %	0.30 %	4.60 %	3 %	La D. M. L. è cercata per iniezione intraperitoneale in cavie. Per le ricerche sulla tossicità, le culture venivano sterilizzate frazionatamente a 58° C.
B. coli II . . .	0.75 %	0.50 %	6.80 %	4.10 %	
B. coli III . . .	0.90 %	0.50 %	5.80 %	3.20 %	
B. coli IV . . .	0.50 %	0.30 %	5 %	2.15 %	

Il fatto già prima constatato dal Lenti in questo Istituto, poi da me, più tardi da molti altri dell'Istituto stesso in cui si è da vari anni studiato con cura indefessa l'argomento, ha, si può dire, tutto il valore di una caratteristica speciale del germe in esame; esso non subisce mai eccezioni, salvo che in un caso semplicemente: quando, cioè, come campione di studio si sceglie un b. coli isolato dalle fecce dei bambini. Allorchè io nella mia tesi di laurea studiavo le varie manifestazioni biologiche del b. coli in rapporto alla varietà dei terreni di nutrizione (1), constatavo che, a differenza di quello che succede per il b. coli dell'uomo adulto, il b. coli del bambino coltivato in mais, invece di aumentare, diminuisce di virulenza; e di pari passo alla virulenza del germe diminuisce la tossicità delle sue culture.

Riferivo allora di 2 b. coli isolati dalle fècce di due bambini, di cui il primo nelle culture in brodo aveva una D. M. L. per cavie iniettate nel peritoneo di 0. 50 %, mentre la stessa dose di cultura in mais non uccideva la cavia; e di cui il secondo con D. M. L. di 0. 25 % per le culture in brodo, a parità di dose nelle culture su mais ugualmente lasciava sopravvivere gli animali iniettati. Il fatto che non può non esser tenuto in conto per riguardo alla etiologia della pellagra nell'uomo, viene qui da me presentato come una eccezione a quella che è regola abituale, che è proprietà essenziale e costante

(1) *Contributo alla biologia del b. coli* (Gazzetta intern. di med. pratica, anno 1902).

del b. coli: la ***esagerazione della sua virulenza e della tossicità delle sue culture, allorchè esso viene coltivato sulla decozione di mais.***

Il fatto però dell'aumento di virulenza delle culture in mais di b. coli non deve esser tenuto in conto di una proprietà neo-acquisita del germe, nè di condizioni del nuovo terreno di nutrizione per cui sia più agevole il moltiplicarsi dei germi stessi.

Allorchè il b. coli viene trapiantato in mais non interviene sui germi innestati nessuna azione attiva del sustrato per cui solo i germi meglio resistenti si sviluppano e crescono dando origine ad una nuova generazione di elementi più selezionati e più forti; le proprietà del substrato medesimo non modificano per niente quelle dei germi in esso innestati onde meglio possano poi questi affrontare la lotta con gli agenti distruttori dell'organismo che essi andranno ad invadere. Rimane il b. coli sul mais, tale quale esso è in brodo; cosa che è tanto vera per quanto se partendo da un b. coli di cui sia stata cercata la D. M. L. per le culture in brodo, lo si innesta in mais ripetutamente, e lo si ripassa quindi un'altra volta in brodo, la D. M. L. di questa nuova cultura se non sarà inferiore, sarà al massimo uguale a quella della cultura da cui si è partiti. Varranno a comprovare questa opinione i risultati di alcune esperienze che io vado a riassumere nella tabella seguente, in cui sono esposti i dati ottenuti (D. M. L.) da culture dello stesso campione di b. coli ripassate di 24 ore in 24 ore nell'ordine appresso segnato e rispettivamente dosate:

TABELLA V.

	Virulenza del b. coli (D. M. L.)			
	1ª cultura — Brodo	2ª cultura — Mais	3ª cultura — Mais	4ª cultura — Brodo
B. coli I	0.75 °/₀	0.40 °/₀	0.45 °/₀	0.70 °/₀
B. coli II	0.60 °/₀	0.35 °/₀	0.30 °/₀	0.60 °/₀
B. coli III	0.55 °/₀	0.20 °/₀	0.20 °/₀	0.60 °/₀
B. coli IV	0.90 °/₀	0.65 °/₀	0.60 °/₀	0.95 °/₀

Si aggiunga poi a questa un'altra osservazione: il b. coli in mais si sviluppa meno abbondantemente che non in brodo, e ciò è tanto

vero per quanto io, fatta la media aritmetica di 8 coppie di conte fatte su culture di 24 ore, ho trovato in un'ansa di brodo-cultura di b. coli 2,818,750 batteri, mentre ne ho trovato 896,250 in un'ansa di pari ampiezza di mais-cultura. Egli è quindi da ammettersi (tenuto conto dell'aumento di tossicità delle culture su mais) che la maggiore attività di queste culture sia da imputarsi soltanto alla maggiore attività delle tossine cui il germe in esame dà luogo allorchè vive su mais o ad una speciale qualità di esse, d'onde ne risulta facilitato il compito deleterio che il batterio va a compiere negli animali da esperienza infettati con tali culture.

Un fatto analogo si ottiene se alla cultura *in vitro* si sostituisce la cultura *in vivo* del b. coli (1). Teniamo presente il fatto sopracitato, l'esagerarsi della virulenza di questo germe, isolato dagli adulti, allorchè viene coltivato in mais, e aggiungiamo, quello che già nella mia tesi di laurea avevo annunciato, che lo stesso germe il quale esagera la sua virulenza in mais, si attenua se viene coltivato su decozione di farina di frumento (2). Ora se partendo da un b. coli di virulenza nota, si dà questo germe assieme al pasto a due cani di cui uno sia alimentato a solo pane di frumento, e l'altro a sola polenta, costantemente si osserva che ripreso 48 ore dopo il b. coli dalle fecce di questi due animali, quello proveniente dal cane alimentato a mais ha una virulenza maggiore, l'altro una virulenza minore del b. coli originario. Quattro cani vengono abitualmente alimentati due con solo pane bianco, due a polenta; tutti giornalmente ingeriscono assieme al pasto la emulsione in acqua di una cultura su agar di un b. coli avente una D. M. L. (cultura in brodo di 24 ore) di 0.45 %. Dopo 2 giorni di questo trattamento si isola il b. coli dalle fecce delle due coppie di cani, si innesta in brodo, si esperimenta su cavie, e si osserva:

	D. M. L.		D. M. L.
1ª coppia (aliment. a pane)	—	2ª coppia (aliment. a mais)	—
	0.65 %		0.10 %
	0.70 %		0.25 %

E lo stesso fatto, la esagerazione cioè della virulenza del b. coli, si osserva anche se si fa a meno di aggiungere al mais dato in pasto, la cultura di b. coli.

(1) Le esperienze che seguono su questo riguardo, con uguale risultato sono state in parte anche eseguite in questo Istituto dal dott. Lembo.

(2) Innestando i 4 b. coli dianzi esaminati in decozione di farina di frumento; la D. M. L. che per le loro culture in brodo era di 0.45, 0.75, 0.90 e 0.50 %, va rispettivamente a 0.60, 0.90, 1.00 e 0.75 %.

Io ho alimentato per un mese con sola farina di mais due cani, tenuti prima in osservazione per un periodo di 15 giorni, durante i quali essi non mangiavano che pane di frumento, ed ho dosato periodicamente la virulenza del b. coli isolato dalle loro fecce ottenendo i seguenti risultati:

TABELLA VI.

	Alimentazione a pane		Alimentazione a polenta		
	Dopo 2 giorni	Dopo 15 giorni	Dopo 2 giorni	Dopo 15 giorni	Dopo 30 giorni
1° cane.	0.75 %	0.85 %	0.50 %	0.40 %	0.45 %
2° cane.	0.90 %	0.85 %	0.65 %	0.50 %	0.40 %

Basta adunque soltanto la alimentazione speciale maidica, basta che della farina di mais pervenga, più o meno modificata dai processi digestivi, nell'intestino, per vedere succedere nell'animale ciò che abbiamo visto accadere nella provetta, per vedere cioè esagerarsi la virulenza del germe in esame. Non sfuggirà però a nessuno che l'analogia dei due fenomeni osservati è soltanto apparente.

Nel primo caso, io ho già detto che l'aumento di attività delle culture vive, più che alle modificate proprietà del germe, è da imputarsi alla aumentata tossicità dei prodotti culturali. Succede in questo caso quello che succede per molti dei patogeni, per il tifo, ad esempio, in cui ripassando da animale ad animale l'essudato peritoneale di cavie morte per infezione da detto bacillo, si arriva ad uccidere una cavia in 24-48 ore con una sola goccia di essudato introdotto nel peritoneo; mentre se s'innesta in brodo tale campione di tifo che apparentemente ha raggiunto un grado così elevato di virulenza, e se ne cerca la D. M. L. si vede con sorpresa che ci si è di poco discostati dalla D. M. L. originaria.

E lo stesso succede per il b. coli allorchè dal brodo lo si passa in mais; la qualità del terreno di nutrizione varia, e varia con essa la qualità dei prodotti di cultura, i quali — se generati da b. coli di adulto — riescono più tossici per gli animali da esperimento e danno al germe vivo che li ha prodotti un'apparenza di aumentata attività che ad esso realmente manca. Lo stesso invece non è da dirsi dell'aumento di virulenza del b. coli nell'alimetanzione maidica.

È in questo caso che tale aumento di virulenza si può considerare come un attributo neo-acquisito del germe: noi tiriamo fuori il germe dal suo abituale terreno di nutrizione, lo passiamo in brodo, e sono proprio queste culture quelle che si mostrano più attive delle altre fatte prima dell'alimentazione speciale.

E bisogna ancora alle già dette aggiungere un'altra proprietà del b. coli, che viene a gettare gran luce sulla origine del veleno pellagrogeno.

Feci già notare che innestato il b. coli in mais, col crescere della virulenza del germe, cresce di pari passo la tossicità delle sue culture; ed ho detto ancora come a questa caratteristica nettamente spiccata per il b. coli degli adulti, se ne contrapponga un'altra perfettamente contraria del b. coli dei bambini, cosa che deve farci ammettere una partecipazione attiva dell'organismo dell'oste, nelle modificate attitudini del germe. L'adulto ed il bambino influiscono in senso perfettamente contrario sull'attività biologica del b. coli: resistono essi differentemente all'azione dei suoi prodotti culturali?

Ecco la domanda che mi sono proposta, e in base a cui ho fatto le seguenti esperienze.

In due matracci contenenti l'uno 100 cmc. di brodo-nutritivo e l'altro 100 cmc. di decozione di mais, innesto lo stesso campione di b. coli proveniente dalle fecce di un adulto. Tengo le due culture per 48 ore a 37° C. e quindi le sterilizzo frazionatamente a 58° C. Inietto quindi le due tossine nel cavo peritoneale, ed in proporzione di 1 per cento in peso, a 4 conigli, di cui due raggiungono i 2 chilogrammi, e due sono di appena 500 grammi. Ecco quello che si è ottenuto:

TABELLA VII.

	Numero	Peso	Quantità iniettata	Tossina da mais	Tossina da brodo
Conigli adulti . .	1°	2030	1 %	Muore infra le 24 ore.	
	2°	1950	1 %	. .	Sopravvive.
Conigli giovani . .	1°	485	1 %	Muore dopo 3 giorni.	
	2°	430	1 %	. .	Sopravvive.

Si torna, come si vede, ad osservare da un lato, il già notato aumento assoluto di tossicità della tossina maidica su quella avuta da cultura in brodo; ma si nota eziandio un'altra cosa di ben grande rilievo, la differente resistenza all'azione della tossina maidica degli organismi giovani e degli organismi adulti. I due conigli in esame muoiono entrambi, è vero; ma è quello adulto che risente più vivamente dell'azione deleteria del veleno batterico tanto da precedere di due giorni con la sua alla morte del coniglio giovane. E lo stesso fatto si verifica se invece di provare con culture pure di b. coli in brodo o in mais, si prova con gli estratti delle fecce di cani alimentati a maccheroni, o a mais. Da sei cani tenuti a vitto ordinario, fatto l'estratto acquoso delle loro fecce nel modo che ho riferito in altra parte di questo lavoro, ho iniettato in circolo con esso rispettivamente 6 coppie di conigli, metà adulti (di oltre 1600 gr.) e metà giovani (di non più di 500 gr.); e costantemente, per ciascuna coppia, l'indice di tossicità, se non era identico, era più basso per i conigli giovani, più elevato per gli adulti.

Ho ripetuto invece la stessa prova con 4 cani tenuti ad esclusiva alimentazione maidica, e in questi casi ho potuto sempre rilevare che la tossicità dell'estratto è maggiore per i conigli adulti e molto minore per i giovani. Non sarà superfluo a dimostrare tale differenza, che io riporti qui le cifre ottenute.

Tabella VIII.

	Tossicità dell'estratto (alimentazione maidica)	
	Conigli giovani	Conigli adulti
1° cane.	5.10 °/o	1 25 °/o
2° cane.	2.66 °/o	1.16 °/o
3° cane.	3.15 °/o	1.00 °/o
4° cane.	2.20 °/o	0.75 °/o

Vi è dunque indiscutibilmente un rapporto cospicuo che dirò soltanto di analogia, e che potrebbe anche essere d'identità, tra il veleno originato in vitro dal b. coli in mais e quello esistente nell'intestino

dei cani maidizzati; giacchè è evidente che nell'uno e nell'altro dei due materiali domina sui fatti generali indotti dalla loro introduzione *in vivo*, una speciale sostanza, una *x*, comune ad entrambi, sostanza che trova nell'organismo dell'adulto un ambiente più favorevole, ed in quello dei piccoli un ambiente meno favorevole su cui spiegare intera la sua azione deleteria.

b) *Azione dei blastomiceti.*

Sono questi i rappresentanti di un'altra delle forme batteriche che costantemente si rinvengono nelle fecce dei cani ad alimentazione maidica. Negli isolamenti su terreno acido glucosato, e nei preparati direttamente allestiti da tali fecce, ho sempre constatato la presenza di detti germi in quantità più o meno rilevante; ma io non credo però che essi abbiano influenza di sorta sull'aumento di tossicità delle fecce maidiche. Innestati a più riprese su brodo acido o su decozione di mais e mantenute le culture per 4 giorni a 20°, iniettate le culture nel peritoneo delle cavie anche a dosi cospicue (3 per cento), questi animali non muoiono, nè mostrano diminuzione di peso. Deve quindi il germe esser tenuto in conto di un semplice saprofita, il quale capitando d'ordinario nell'intestino, allorchè con l'alimentazione maidica diventa acida la reazione del contenuto intestinale, trovandovi un idoneo terreno di nutrizione, vi si sviluppa senza però impartire ad esso un rilevabile speciale carattere di tossicità. Ciò è tanto vero per quanto basta alimentare i cani a pasto ordinario (maccheroni) e somministrare ad essi assieme al pasto una cultura in agar di b. coli, per vedere, senza che si esageri la tossicità delle fecce, comparire in queste, con una spiccata reazione acida, un gran numero di blastomiceti. Ecco in proposito quello che ho potuto osservare:

Due cani tenuti a pasto ordinario ingeriscono assieme al pasto una cultura su agar di b. coli. Saggiata la reazione nelle fecce dopo 4 giorni di questo trattamento la trovo fortemente acida; l'isolamento fatto da esse mostra la comparsa di un nuovo componente la flora batterica intestinale, la comparsa dei blastomiceti, germi però non patogeni per le cavie e la cui presenza non coincide con un aumento di tossicità delle fecce. Di fatti dosata sui conigli col solito metodo dell'estratto acquoso, la loro tossicità prima e dopo un mese di trattamento non ho trovato marcate differenze.

c) *Azione delle muffe.*

Sono questi i microfiti che — riprendendo le antiche idee del Ballardini — dai seguaci della teoria del mais guasto nella etiologia della pellagra, si vorrebbero mettere in valore. Preoccupato, come desidero di essere, di mantenermi puramente obbiettivo nella esposizione di questo mio lavoro, tralascio di discuterne le opinioni e di vagliarne le esperienze; dirò soltanto brevemente di alcune mie osservazioni fatte in proposito e di cui mi riserbo di parlare più ampiamente in altra occasione, in cui mi occuperò *ex professo* della quistione.

Il *penicillium glaucum* è fra le muffe quella che ho avuto sempre maggior occasione di vedere nella farina di mais servita all'alimentazione dei miei cani, e nelle fecce di questi. Ora, tenuto conto che le spore di *penicillium glaucum* non resistono che solo per un quarto d'ora ad una temperatura di 70° C., è da escludersi che esse possano penetrare vive e vitali assieme alla polenta nell'intestino dei cani. Inoltre, se si ha cura di fare un isolamento dalle fecce di questi cani maidizzati, prendendo il materiale direttamente dal retto, il penicillio manca.

Esso quindi deve esser tenuto in conto di un inquinamento di tali fecce con germi dell'aria, allorchè si fa l'isolamento da fecce già emesse da un tempo più o meno lungo.

Potrebbe il veleno di tali spore, dimostrato dal Dipietro, avere influenza sulla tossicità delle fecce; ma le fecce di cani tenuti a pasto ordinario e a cui si somministravano contemporaneamente grosse quantità di tali spore (1/2-1 gm.) non hanno mostrato mai la caratteristica reazione delle fecce maidiche (1), nè mai ho potuto rilevare — pur trovandovi l'albumina, anche in dose dell'1-1 1/2 per mille — tracce di acetone nelle urine.

***

Aggiungerò infine che fra i componenti della flora batterica intestinale nei cani maidizzati, viene a pigliar posto, durante gli accessi di diarrea, una *sarcina alba*. Ma la diarrea non è che un incidente nel corso della malattia; ed è per tale ragione che io non ho creduto di fare della sarcina rinvenuta oggetto di speciali indagini.

---

(1) Le spore di *penicillium* adoperate, erano state spedite gentilmente dal dottor Dipietro a questo Istituto.

***

Riassumendo, quindi, dai fatti che ho esposto innanzi tutto si desume come *nei cani la costante ed esclusiva alimentazione maidica dia luogo ad una malattia mortale in cui si potrebbe anche vedere l' equivalente della pellagra dell' uomo.* Dire che questa malattia sia da mettersi in conto della ingestione di un veleno già preformato nel mais, per effetto di speciali processi fermentativi, non è il caso. I cani su cui ho esperimentato hanno sempre mangiato farina di mais di ottima qualità, in cui costantemente quella reazione dei fenoli, che, a dire del Gosio, è l' indice immancabile dell' avaria di tale farina, ha fatto sempre difetto.

E allora, escludendo senz' altro dalla disamina quei blastomiceti che si sono mostrati sempre privi di potere patogeno, non rimane a campeggiare, a dominare tutto l' andamento della malattia altro che il b. coli. Esso che nella decozione di mais *in vitro*, pur impartendole speciali caratteri, non trova mezzo di potersi abbondantemente sviluppare, nel chimo da mais, e dentro l' intestino rinviene invece un ambiente ottimo di vita. Ivi accresce le sue forze riproduttive e migliora le proprie attitudini per come ne fanno fede la constatata esagerazione di virulenza, e l' aumento in numero nelle fecce maidiche. Germe polimorfo per ciò che riguarda le sue attitudini biologiche, e squisitamente sensibile alla variazione di natura dell' *habitat*, perde nell' intestino del bambino quella proprietà che esso tiene nell' intestino dell' adulto, di esagerare cioè la attività delle culture vive in mais di fronte a quella delle culture in brodo. Quest' aumento di attività, però, non è condizione sufficiente perchè infranta la barriera epiteliale della mucosa intestinale, e gli altri eventuali ostacoli d' ordine biologico che la mucosa stessa gli oppone, venga dall' intestino a generalizzarsi nell' organismo. Sterili, per come ho detto, sono rimaste le prove culturali fatte da tutti gli organi interni dei 4 cani morti in seguito ad alimentazione maidica; assenti di ogni infiltrazione batterica gli strati della mucosa intestinale di tali cani anche là dove per la presenza di ulcerazioni patenti potevasi più ragionevolmente crederla possibile; sterili — aggiungerò — son rimasti gl' innesti fatti dal sangue e dalla milza di due cani alimentati per circa due mesi con polenta cui giornalmente si aggiungeva una cultura su agar di b. coli.

Ma se nelle nuove energie di cui per il b. coli è fonte un chimo maidico, il germe non trova ancora risorse sufficienti per potere dall' intestino sfaldato, congesto, emorragico, ulcerato passare ad in-

vadere l'organismo intero, trova pur tuttavia ivi il mezzo di produrre un veleno, che io non ho isolato, ma le di cui peculiari particolarità ci dànno in mano il mezzo di riconoscerlo. Le fecce maidiche sono più tossiche per gli adulti e meno di molto per i conigli giovani: ebbene, le culture di b. coli in mais godono della stessa proprietà, per come ne fanno fede da un canto i risultati che ho segnati nella tabella VI e dall'altro l'osservazione che qui aggiungo.

Un cane mantenuto a vitto ordinario ingerisce giornalmente 20 cm³ di tossina maidica di b. coli; saggiata la tossicità delle fecce di questo animale su conigli, trovo che il loro estratto acquoso uccide un coniglio adulto in proporzione di 2. 15 cm³ °/₀ mentre la cifra sale a 4. 05 °/₀ allorchè lo stesso estratto viene provato su conigli giovani. Esclusa adunque l'attività biologica del germe vivo, le sue culture su mais, con i prodotti tossici in esse elaborati dal germe stesso, *in vitro* o *in vivo* ripetono alla precisione quello che è fenomeno essenziale e caratteristico della intossicazione acuta per fecce maidiche.

Basta però cambiare il terreno di nutrizione e sostituire il brodo al mais, perchè il fenomeno constatato più non si avveri. In pari tempo e con lo stesso germe servito ad allestire le tossine di cui ho sopra riferito, mi preparo delle tossine in brodo che — *coeteris paribus* — vengono ingerite in dose di 50 gr. al giorno da un secondo cane. Fatto l'estratto dalle fecce in pari data del precedente, e dosato sui conigli, di questi un coniglio adulto muore sul colpo con una quantità di 2. 15 °/₀, un coniglio giovane con 2. 40 °/₀. E si aggiunga a ciò che delle urine dei due cani, quelle appartenenti al cane intossicato con tossine in brodo mostrano presente soltanto l'albumina, le altre invece assieme all'albumina fanno chiaramente vedere (met. Lenobel) presenza di acetone.

B. coli, quindi, e chimo maidico, sono, a mio credere, i due fattori necessari e sufficienti per la produzione di un veleno ad azione specifica, il quale, una volta annullata quell'azione protettiva della mucosa intestinale — da cui, più ancora che dal fegato (Queirolo), risulta difeso l'organismo dalla penetrazione dei prodotti tossici intestinali — entra in circolo, spiega innanzi tutto la sua azione deleteria sul rene d'onde la precoce comparsa dell'albumina nelle urine —, attacca le cellule ganglionari del midollo spinale, dei gangli spinali e del celiaco (comparsa dell'acetone nelle urine), lede quindi le capsule surrenali, il pancreas, sospendendo infine, in mezzo ad un generale deperimento la vita dell'animale. Aggiungerò infine che interviene a modificare, sospendendoli anche, i fatti sopraesposti un terzo fattore di cui già è nota la influenza nei processi di intossicazione intestinale, e a cui

io mi riserbo in seguito di dedicare uno studio particolare: le vicissitudini atmosferiche.

Istruttivo a questo riguardo riesce il paragone dell'andamento della malattia nel IV cane, con le contemporanee oscillazioni della temperatura atmosferica e dell' umidità relativa. In tale cane, la lunga durata della malattia ci permette di distinguere in essa tre periodi: Un primo periode che va dalla prima quindicina di marzo alla 1ª quindicina di aprile, epoca in cui al massimo di tossicità delle fecce (1. 40 %) e al minimo di peso dell'animale (kg. 9. 000) precede un periodo di bassa temperatura (17° C. al massimo) e di secchezza dell'atmosfera (65/100 nella 1ª quindicina di marzo). Aumenta quindi la temperatura, la cifra dell' umidità relativa si eleva e migliorano in pari tempo le condizioni di salute del cane fino alla 1ª quindicina di settembre (2° periodo). S'inizia allora un terzo periodo in cui in primo tempo la temperatura si mantiene ancora discretamente alta (25°-27° C.), ma l'umidità relativa diminuisce (72/100-74/100), e quantunque da prima il peso dell'animale seguiti a elevarsi (nel mese di ottobre giunge a kg. 10.000), la tossicità delle fecce subisce un rapido aumento portandosi in meno di quindici giorni da 2.70 % ad 1.30 %. Compare negli ultimi di ottobre la diarrea, nei primi di novembre il vomito, e dalla 2ª quindicina di novembre in poi, con il progressivo abbassarsi della temperatura, col diminuire dell'umidità relativa (T. = 15° - U. R. = 72/100) coincide un progressivo aumento della tossicità delle fecce, ed una progressiva e cospicua diminuzione di peso dell'animale che viene poi ucciso nella 2ª metà di febbraio.

***

Questi i fatti, dal cui esame non mi pare troppa pretensione il desumere che *uno studio sull'uomo, fatto sulla guida degli insegnamenti che essi ci dànno, potrebbe forse portare grande luce alla conoscenza della etiologia della pellagra.*

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE.

Tavola VII.

Fig. 1. — Tratto di mucosa intestinale (digiuno), congesta e con ulcerazioni di dimensioni variabili (grandezza naturale).

Fig. 2. — Sezione fatta a livello di una piccola ulcera intestinale (color. ematossilina ed eosina).

Fig. 3. — Sezione di pancreas: emorragie in un corpuscolo di Langeraus, e degenerazione granulosa della massa protoplasmatica (color. ematossilina).

Fig. 4. — Sezione di rene: glomerulo-nefrite e note di nefrite parenchimale (color. picro-carminio).

Tavola VIII.

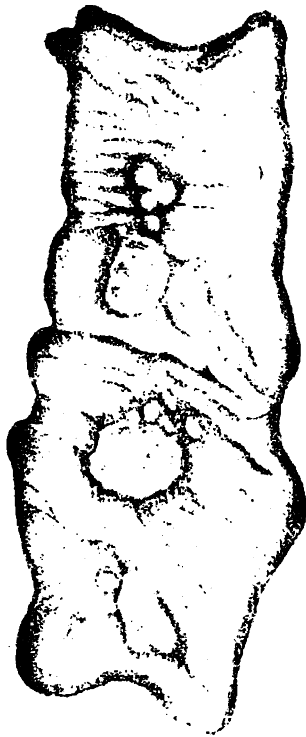
Fig. 1. — Sezione di midollo spinale a livello della porzione dorsale: piccole chiazze di degenerazione (*a*) nel fascio fondamentale dei cordoni laterali (metodo Weigert-Breglia).

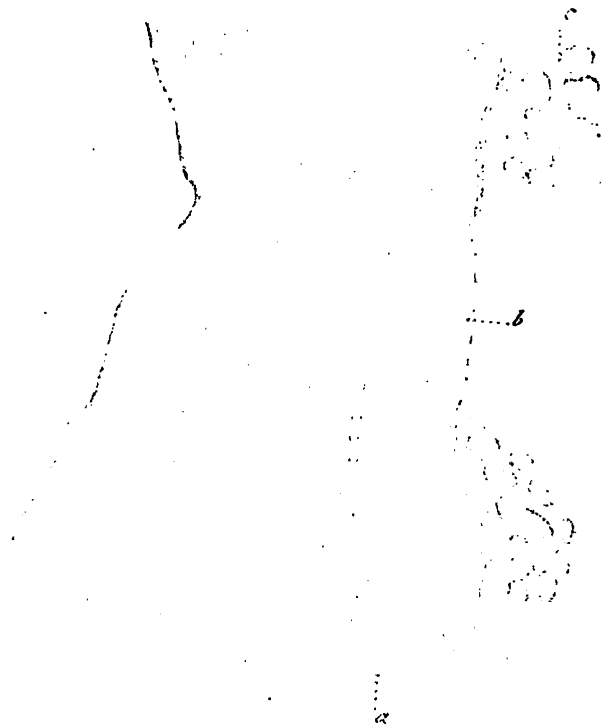
Fig. 2. — Sezione di midollo spinale (porzione dorsale) con residui di una emorragia pregressa (*a*); degenerazione vacuolare (*b*) e ialina (*c*) in cellule nervose delle corna posteriori (metodo Boccardi).

Fig. 3. — Cellule ganglionari delle corna posteriori (sezione lombare del midollo spinale) con degenerazione ialina; il nucleo è spostato alla periferia; dei granuli di Nissl, si mostrano ancora solo i più periferici (metodo Boccardi).

Fig. 4. — Sezione di ganglio spinale con elementi specifici, in differenti stadi di atrofia semplice e degenerativa (metodo Boccardi).

Fig. 5. — Sezione di ganglio celiaco: degenerazione granulosa degli elementi specifici e atrofia degenerativa; sclerosi del connettivo del ganglio.

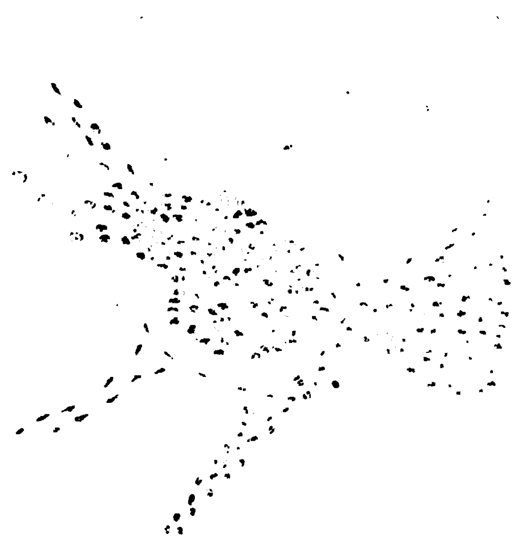




2
b
a

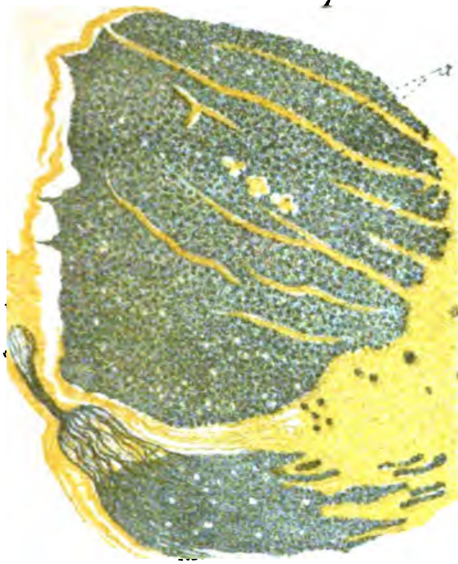


3

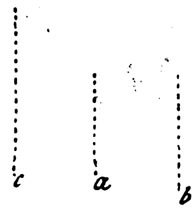


4

1



2



3

4

5

6

C. Amati dis. *Lit. A. Scrino*

VII.

Alterazioni isto-patologiche nelle intossicazioni croniche da tossina di *bacterium coli.*

per il dott. F. PULVIRENTI-AMORE.

I precedenti lavori dimostrano che sottoponendo dei cani ad una alimentazione esclusivamente maidica, gli animali muoiono dopo un periodo di tempo più o meno lungo, e che la loro morte deve ascriversi ad una auto-intossicazione da *b. coli.* Il Paladino ha descritto una speciale serie di alterazioni anatomo-patologiche negli organi interni di questi animali. Io, corrispondendo all'invito del prof. de Giaxa, intrapresi delle ricerche per constatare se, mediante la intossicazione lenta dei cani a mezzo di tossina di *b. coli*, fosse possibile ottenere delle lesioni paragonabili a quelle dal Paladino descritte nei cani maidizzati. A questo scopo mi sono servito di 5 cani, ed ho distribuito le esperienze come segue:

1° cane. Alimentazione ordinaria e iniezioni intraperitoneali di tossina di *b. coli* coltivato in decozione di mais.

2° cane. Alimentazione ordinaria e iniezioni intraperitoneali di tossina di *b. coli* coltivato in brodo nutritivo.

3° cane. Alimentazione ordinaria e ingestione di brodo-tossina di *b. coli.*

4° cane. Alimentazione ordinaria e ingestione di mais-tossina di *b. coli.*

5° cane. Alimentazione ordinaria e iniezioni intraperitoneali di mais-tossina di *b. coli.*

Ebbi cura di adoperare cani robusti, ben nutriti, di media età e di peso poco differente. Io stesso ne osservavo scrupolosamente l'alimentazione, che era costituita da maccheroni con grasso e pane.

La tossina è stata preparata con *b. coli* mantenuto a costante virulenza, mediante passaggi periodicamente ripetuti nelle cavie. Il brodo o la decozione di mais sano, innestati con questo batterio, venivano tenuti al termostato a 37° C. per cinque giorni, e poi sterilizzati frazionatamente alla temperatura di 56° C. per sei ad otto giorni di seguito, e per un'ora al giorno.

La tossina che non veniva adòperata se non quando innesti in agar da essa praticati e tenuti per 48 ore al termostato non rimanevano sterili, fu poi distribuita in bottiglie a tappo a smeriglio, della capacità di cmc. 200, colorate, e conservate al riparo della luce e in luogo fresco (11° C.). Dosate a varie riprese, per iniezioni intraperitoneali nelle cavie, la tossicità della tossina in brodo e quella della tossina in mais, ho avuto per la prima: una dose minima letale di cmc. 4 per cento, per la seconda di cmc. 2.5 per cento.

Nell'esporre il corso di ogni esperimento, per il cane che è stato trattato con iniezioni intraperitoneali di tossina in brodo di carne, trascrivo le diverse settimane, mentre per quello che ebbe le iniezioni di tossina da mais, riporto le osservazioni fatte di tre in tre giorni, sia perchè il tempo è stato relativamente breve, sia per la grande importanza dei fenomeni osservati.

La quantità di tossina adoperata veniva gradatamente aumentata.

Cane 1° — Intossicazione cronica con tossina di b. coli coltivato in decozione di mais di buona qualità. — Via peritoneale.
Cane peso gm. 6000.

Data	Peso in grammi	Quantità di tossina somministrata in cmc.	Note sul corso dell' intossicazione
24 gennaio	6000	20	
29 »	5900	30	
1 febbraio	5830	45	
5 »	5710	55	Il giorno 5 febbraio il cane incomincia ad avere delle scariche diarroiche, e dei conati di vomito.
8 »	5600	65	
12 »	5490	75	Dal giorno 12 febbraio mostra un notevole abbattimento, la coda dimessa tra le gambe; andatura incerta. Interviene quindi un periodo di stitichezza. Nel corso del giorno ha dei vomiti alimentari o semplicemente mucosi.
15 »	5350	85	
19 »	5200	95	Dal giorno 19 febbraio addimostra l'andatura paretica con evidente carattere spastico negli arti posteriori.
22 »	5120	105	
26 »	4900	115	La diarrea incominciata il 19 febbraio non lo lascia più, e, dal giorno 26 fino a quello della morte, è addirittura sierosa e molto abbondante.
1 marzo	4720	125	
4 »	4580	135	Dal 3 marzo non si regge più in piedi. I vomiti sono frequentissimi.
6 »	—	—	L'appetito l'ha abbandonato. Il giorno 6 lo trovo morto.

Riassumendo: le note più importanti mostrate da questo cane, sono: Il dimagrimento cospicuo, i vomiti frequenti, la diarrea, i disturbi dell'andatura.

Necroscopia. — Cadavere molto deperito; pannicolo adiposo quasi del tutto assente; muscoli addominali atrofici.

Nel cavo peritoneale notasi del liquido torbido (resto del liquido iniettato). Il peritoneo è liscio e lucente. L'epiploon è privo di grasso. La milza, di colorito rosso-cupo, è molto impicciolita, e al taglio mostra un cospicuo aumento delle trabecole connettivali.

Rene congesto. Capsule surrenali con sostanza midollare di aspetto gelatinoso, e brunastra; sostanza corticale atrofica. Intestino con pareti assottigliate; la mucosa è cosparsa di denso muco, qua e là notansi nel tenue delle chiazze emorragiche con qualche punto ulcerato. Glandole di Peyer molto tumefatte. Grosse e indurite le glandole del mesenterio.

Fegato ingrandito con accenno a degenerazione grassa. Cuore piccolo, flaccido.

Esame istologico. — Appena estratti dal cadavere, i pezzi venivano messi ad indurire in liquido di Heidenheim modificato, o in liquido di Flemming, e qualche volta in alcool.

L'inclusione è stata fatta sempre in paraffina.

Le sezioni furono colorate con più metodi; però, nelle sezioni del *sistema nervoso*, ho preferito sempre il metodo Boccardi, che oltre ad esser molto spicciativo, dà delle belle e nette colorazioni cellulari.

Intestino. — Ho indurito uno dei tratti più alterati ed ho colorato le sezioni in ematossilina; in questi tagli ho potuto vedere la ulcerazione riportata nella fig. II della tavola X, dove chiaramente si vede una perdita di sostanza che interessa la mucosa, e che si approfonda nella sottomucosa la quale appare sclerotica. I tratti circostanti di mucosa sono invasi da una cospicua infiltrazione parvi-cellulare.

Preparati allestiti per la ricerca dei bacteri nei tessuti, fecero notare la totale assenza di questi fra e nelle diverse tuniche intestinali.

Pancreas. — Rigonfiamento torbido degli elementi cellulari; congestione vasale e piccoli focolai emorragici disseminati in tutto quanto il parenchima.

Capsula surrenale. — Elementi della sostanza corticale e midollare discretamente colorabili; si notano, oltre alle note di congestione dell'organo, delle piccole emorragie puntiformi, interessanti specialmente la sostanza midollare. Negli elementi cellulari della porzione periferica della sostanza midollare e nella zona limitrofa della sostanza corticale, si nota una uniforme diffusa infiltrazione, più che degenerazione grassa.

Rene. — Glomuralo-nefrite e nefrite parenchimale acuta.

Sistema ganglionare simpatico (Celiaco, fig. I, tavola X, gangli simpatici cervicali).

Iperplasia connettivale molto cospicua che si sorprende in vari stadi, a seconda che si osservano il celiaco o il ganglio cervicale superiore, o lo stellato.

I vasi sanguigni dei gangli trovansi molto distesi e fortemente ripieni di sangue. Arterie con pareti molto esili, endotelio tumefatto. Qua e là notasi qualche piccolo focolaio emorragico.

Degenerazione granulosa e ialina interessante la quasi totalità degli elementi ganglionari. È quasi generalmente osservabile il fatto che alla cromatolisi cui soggiace il corpo protoplasmatico delle cellule ganglionari, di queste la porzione più resistente è la periferica: poichè, mentre per la colo-

razione specifica la porzione centrale del corpo cellulare assume una tinta uniforme, od un aspetto finamente reticolato, la porzione periferica mostra ancora nettamente colorati i caratteristici granuli di Nissl.

Gangli intervertebrali (fig. II, Tav. IX). — Assieme alle note di degenerazione ialina e di degenerazione granulosa, e più ancora di queste, spicca la frequenza dell'atrofia semplice degli elementi ganglionari, che, distrutti, anche in questo caso sono sostituiti da consecutiva proliferazione connettivale. Il nucleo in una gran parte delle cellule giace sempre alla periferia, qualche rara volta fa ernia fuori del corpo cellulare.

Midollo spinale (fig. I, Tav. IX). — Assenza di degenerazione fascicolare. Lungo l'asse grigio, specialmente in corrispondenza della porzione lombare e dorsale del midollo, si nota, a preferenza nelle cellule nervose delle corna posteriori, una marcata cromatolisi. Il protoplasma delle cellule, perduti i caratteristici granuli di Nissl, si mostra omogeneo, finissimamente granuloso e, direi quasi, di aspetto pulverulento. Il contorno cellulare, d'ordinario ben definito, si sperde qualche volta insensibilmente nella tinta della glia circostante. In mezzo a questa massa necrobiotica del protoplasma, spicca il nucleo con contorno d'ordinario regolare, qualche volta raggrinzato, con nucleolo quasi sempre ben conservato e colorato più intensamente. Qualche volta si può vedere scomparsa ogni traccia di limite tra la sostanza nucleare e la protoplasmatica circostante. Il nucleo è in un vero stato di cariolisi.

Per riguardo ai prolungamenti cellulari nervosi, non è raro vederli rigonfiati e, in punti diversi della loro lunghezza, come varicosi.

Ecco ora il prospetto del 2° esperimento:

Cane 2° — Intossicazione cronica
con tossina di b. coli coltivato in brodo. — Via peritoneale.
Cane peso gm. 6800.

Data	Peso in grammi	Quantità di tossina somministrata in cmc.	Note sul corso dell' intossicazione
9 novemb.	6800	20	Il giorno 12 novembre mi accorgo che il cane ha fecce molto scolorate, e se ne sta abbattuto e solitario.
16 »	6700	40	
23 »	6720	60	Dal giorno 23 novembre appare stitichezza.
30 »	6630	80	
7 dicemb.	6680	100	
14 »	6700	120	
21 »	6620	140	Il giorno 21 dicembre incominciano a modificarsi le fecce, le quali sono di color normale e ben conformate.
28 »	6600	160	
4 gennaio	6590	180	Dal 4 gennaio il cane riacquista il brio di prima.
11 »	6600	200	
18 »	6570	220	
25 »	6610	240	Il 25 gennaio dopo la iniezione mostrasi abbattuto.
1 febbraio	6600	260	
8 »	6580	280	
15 »	6590	»	Dal giorno 15 febbraio inietto sempre la stessa dose.
22 »	6610	»	
1 marzo	6600	»	
7 »	—	—	Si uccide il giorno 7 (cloroformio).

Necroscopia. — Cadavere ben conservato; cellulare sottocutaneo con pannicolo adiposo discreto.

Nel cavo peritoneale trovasi un po' di liquido torbido (residuo della iniezione). Peritoneo lucente, liscio, con piccole chiazze di aderenze allo epiploon sottostante (peritonite reattiva) che è ben conservato e con molto grasso.

Milza di volume, consistenza e colore normale, succolènta, cedevole al taglio, con follicoli Malpighiani appariscenti. — Stomaco a pareti spesse e con mucosa normale. Intestino tenue iperemico (morte per cloroformio). Placche di Peyer un po' tumefatte.

Pancreas normale con la coda un po' iperemica. — Fegato anch'esso normale, congesto in qualche lobulo, pallido in qualche altro, con disegno degli acini molto appariscenti.

Capsule surrenali e rene perfettamente normali, tranne un po' di iperemia. — Cuore buono.

Esame istologico. — Fatti dei tagli su tratti differenti dell'intestino, niente potè riscontrarsi degno di nota. — E lo stesso va detto per il celiaco ed i gangli cervicali superiore e stellato, i quali, se si fa astrazione di una lieve iperplasia connettivale e di qualche cellula ganglionare atrofica, niente altro mostrano di rilevante.

Nessuna alterazione si potè rilevare nel midollo spinale, in tutta quanta la sua lunghezza.

Dovrei riportare adesso i prospetti del corso dell'intossicazione degli altri cani; ma per amore di brevità mi limiterò a dire quel tanto che basta per far rilevare le note differenziali mostratesi nell'andamento della intossicazione e nel reperto anatomo-patologico, tra questi animali ed i precedenti.

In quanto al 3° esperimento, cioè quello a cui si è dato col pasto la tossina in brodo, ho incominciato a darla nella quantità di 40 cmc. ed ho aumentato di 10 cmc. ogni tre giorni sino ad arrivare a farne mangiare tanta per quanto lo consentiva l'animale. E in tutto il corso dell'esperimento, che è durato dal 10 novembre al 9 marzo — giorno in cui l'animale fu ucciso — niente di anormale ebbi a notare: peso del corpo oscillante, ma mai delle diminuzioni di peso costanti; fecce normali, mai vomito; l'animale si mantenne sempre brioso.

All'autopsia niente di notevole, tranne un po' di iperemia degli organi (morte per cloroformio).

Ritenni superfluo di fare l'esame istologico degli organi.

Ben altro fu tl risultato avuto col cane, cui somministrai per ingestione la tossina da coltura di mais (4° cane).

L'esperimento è incominciato il 1° di gennaio, ed in quanto alla quantità di tossina fu uguale a quella somministrata al cane precedente. Vi furono alternative di stipsi e diarrea, e sebbene in principio l'animale si fosse mostrato allegro, e scherzasse con gli

altri cani, dopo la seconda metà di febbraio cominciò a divenire cupo, ed a stare solitario. Mangiava poco e la diarrea si fece ostinata. Qualche vomiturazione ogni tanto lo sorprendeva. Dimagriva lentamente.

Il giorno 8 marzo lo ammazzo e all'autopsia riscontro per l'intestino i caratteri precisi che riscontrai nel cane sottoposto alle iniezioni di tossina in mais, ma meno accentuati.

Nell'epiploon molto scarso il grasso; e nel resto degli organi niente da notarsi ad occhio nudo.

All'esame microscopico riscontro nei singoli organi gli stessi fatti osservati nel cane trattato per iniezioni intraperitoneali con maistossina, ma meno avanzati.

Un quinto cane fu sottoposto alle iniezioni intraperitoneali di tossina in mais con risultati identici a quelli avuti col primo.

Si ripeterono gli stessi sintomi: dimagrimento eccessivo, vomiti, diarrea sfrenata, e morte spontanea. L'andatura divenne paretica e si notò pure asimetria pupillare.

Alla necroscopia si riscontrarono le medesime alterazioni intestinali ed identiche lesioni all'esame microscopico come nel cane N. 1.

Dai fatti osservati risulta che:

1° le tossine del *bacterium coli* coltivato in mais, come è già stato da altri dimostrato, sono molto più attive di quelle delle culture in brodo:

2° la tossina maidica del *bacterium coli* è fornita di una azione specifica, che manca od è molto meno attiva nelle brodo-culture dello stesso germe; l'azione è spiccatamente elettiva sulla mucosa intestinale e sugli elementi cellulari del sistema nervoso;

3° le lesioni anatomo-patologiche riscontrate negli animali da esperimento, lentamente attossicati con tossina di *bacterium coli* in mais, e la sintomatologia osservata in vita, ripetono, quasi fedelmente, il complesso dei sintomi e delle lesioni anatomo-patologiche constatati negli animali tenuti ad esclusiva alimentazione maidica.

F. Pulvirenti

Fig. I.



Fig. II.

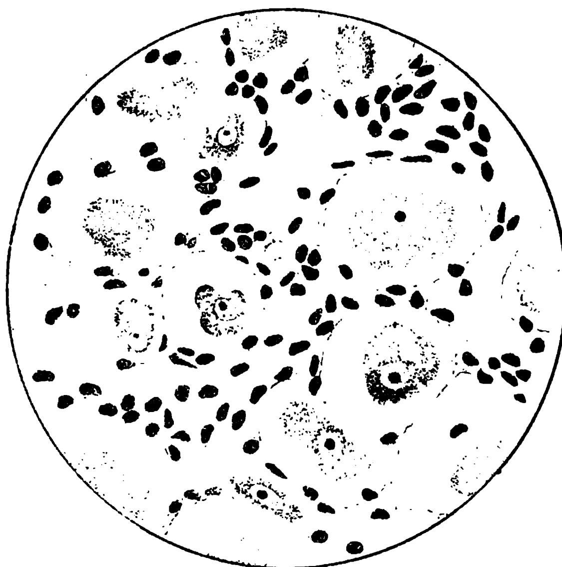


Fig.

Fig

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE.

Tavola IX.

Fig. I. — Midollo spinale (sezione dorsale).
Cromatolisi e cariolisi negli elementi nervosi.
Varicosità dei loro prolungamenti.
Leitz. Oc I, imm. $^{1}/_{12}$.

Fig. II. — Ganglio intervertebrale.
Atrofia degli elementi nervosi.
Cromatolisi e cariolisi.
Leitz. Oc I, imm. $^{1}/_{12}$.

Tavola X.

Fig. I. — Ganglio celiaco.
Cromatolisi e degenerazione ialina, spostamenti dei nuclei alla periferia della cellula.
Iperplasia connettivale.
Leitz. $^{1}/_{7}$.

Fig. II. — Sezione di intestino (digiuno).
Ulcerazione della mucosa che si affonda anche nella sottomucosa.
Leitz. $^{3}/_{3}$.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

Sulle relazioni tra batteri proto-, meta- e paratrofi e in particolar modo sulle relazioni tra eberthiformi, pseudoeberthiformi e forme batteriche superiori.

Seconda serie di ricerche per il dott. **O. CASAGRANDI.**

Nella memoria precedente (1) ho avuto occasione di far rilevare come germi per caratteri morfologici identici al b. di Eberth, presenti nelle acque e nelle feci, potevano venire agglutinati dal siero di animali immunizzati verso il tifo, dopo che si erano sottoposti a procedimenti i quali facevano acquistare loro un certo grado di patogenicità.

Nella stessa memoria fecero anche rilevare come qualcuno di questi germi coltivato su blocchetti di caolino, impregnati di soluzioni minerali semplicissime, seguendo una tecnica che ho successivamente descritta (2), assumesse caratteri del tutto diversi, tali anzi da poterlo paragonare a un germe che è abbastanza comune nell'ambiente e che per certi caratteri corrisponde alle sommarie ed incomplete descrizioni che sono state date del *b. zopfi.*

Aggiungevo ancora che lo stesso *b. zopfi*, messo a coltivare nei mezzi contenenti i prodotti solubili ed insolubili del b. Eberth, in difetto di ossigeno, pur rimanendo del tutto innocuo per le cavie ed i conigli, acquistava la proprietà di venire agglutinato da animali immunizzati verso il b. di Eberth, ed esso stesso impartiva ai sieri dei conigli proprietà agglutinante fortissima verso i bacilli tifici.

(1) Questi Annali. Roma, 1901.
(2) R. Soc. d'Igiene. Milano 1901, pag. 412.

Nel contempo, messo questo *b. zopfi* a coltivare su dischi di caolino imbevuti di soluzione di fosfato sodico, ottenni filamenti lunghi ed intrecciati con terminazioni a catenella e in alcuni casi rimasi persino indeciso se mi trovassi di fronte a vere e proprie ramificazioni, le quali mi fecero pensare ad una origine streptotricea del germe.

Queste ricerche pazienti e accurate vennero da me eseguite a vari intervalli, e benchè mi conducessero a risultati inattesi, e non mi lasciassero dubbio sulla loro esattezza, ho voluto ripeterle per sommi capi, ed ecco quanto ho potuto notare:

A) 1. Coltivando in blocchi di caolino imbevuti di soluzioni minerali alcuni similtifi non gasogeni, patogeni per gli animali, non agglutinabili col siero di individui tifosi, si nota la formazione di lunghi filamenti di streptobacilli e bene spesso gli estremi dei filamenti si frammentano in corpiccioli più piccoli, ovalari, simili a cocchi; nessun filamento però si ramifica.

2. Passando questi germi filamentati in gelatina poco densa, sempre a base di soluzioni minerali, si formano colonie ramose, flagellate, che ricordano precisamente quelle del *b. zopfi*, sebbene non raggiungano, a parità di tempo e di data, la grandezza di quelle di quest'ultimo bacterio.

B) 1. Coltivando sugli stessi blocchetti di caolino imbevuti di sostanze minerali vari stipiti eberthiani, patogeni per le cavie, agglutinabili col siero di individui tifosi, si nota a lungo andare la formazione di numerose forme filamentose, alcune delle quali ad articoli estremi molto più corti degli altri: non si nota però mai alcuna ramificazione.

2. Passando questi germi in gelatina poco densa, appare tipica la formazione delle colonie a flagelli descritte dal Piorkowksy e la grande somiglianza con le colonie piccole, profonde del *b. zopfi*, non però quella con le grandi ramose a salsiccia dello stesso germe.

C) 1. Coltivando in blocchi di caolino imbevuti di soluzioni minerali forme svariate di germi riferibili a quelle descritte come *b. zopfi*, appare manifesta la costante filamentazione dello stesso germe e la terminazione a catenule degli estremi del germe stesso in un processo di moltiplicazione attivissimo: osservando accuratamente, filamento per filamento, in mezzo all'intreccio, quelle forme le quali possono per la loro disposizione far pensare a ramificazioni sembra derivino dalla accidentale giustapposizione di altri germi; solo alcune volte può presentarsi tale da lasciare dei dubbi: però osservando a forte ingrandimento non pare si noti continuità tra le singole parti della pseudoramificazione.

2. Passando il germe così filamentato in gelatina poco densa, si nota, in superficie la formazione di colonie raggiate filamentose, a sole, in profondità quella di colonie filamentose, più o meno ricordanti le colonie del tifo e del similtifo, coltivati nella stessa maniera.

3. Passando il germe in gelatina più densa (10 $^{0}/_{0}$) continuano a formarsi colonie raggiate, ramose a salsicciotto, ma accanto a queste se ne formano anche di trasparenti, translucide, e spesso venate, le quali, come ho potuto notare facendo culture a goccia pendente, traggono la loro origine dalle forme cocciche terminali dei filamenti.

Queste colonie hanno grandissima somiglianza con colonie di similtifo: però a lungo andare emettono barbe e rami e ripetono la forma più o meno irregolarmente raggiata, che è caratteristica del batterio.

Da tali ricerche appariva evidente:

1. Che vi fossero relazioni morfologiche tra il similtifo studiato e il *b. zopfi*.

2. Che corressero analoghe relazioni tra lo stesso similtifo e il b. di Eberth.

In altri termini potevano dedursi intimi rapporti tra il b. di Eberth, il similtifo e il *b. zopfi*, rapporti che venivano avvalorati dal criterio siero-diagnostico e dal criterio immunizzante di cui è fatta parola nella prima memoria.

Epperò, a definire la quistione, ritornai sui dati biologici già discussi e dei nuovi ancora ne sottoposi ad esame, ricorrendo alla siero-reazione, all'azione patogena, all'azione immunizzante, allo studio della sensibilità termica e del geotropismo.

I.

Ricerche per mezzo della siero-reazione.

Indipendentemente dallo studio delle agglutinine e delle coaguline che in questi ultimi tempi ha fatto grandi progressi, ho voluto vedere se facendo agire sugli estratti dei corpi batterici o i sieri degli animali inoculati col *b. zopfi*, col similtifo, col *b. typhi*, o gli estratti leucocitici, potessi ottenere delle reazioni specifiche che mi guidassero alla identificazione o differenziazione di questi germi, facendo precedere a queste, altre ricerche sugli estratti del bacillo del carbonchio per ben addentrarmi nel meccanismo del fenomeno.

A tal uopo ho seminato del carbonchio su agar a piatto e ottenuto lo sviluppo di grandi quantità di materiali, l'ho trattato con carbonato sodico in soluzione all'1 per cento. Il filtrato alla carta dopo tale trattamento ho quindi precipitato con la miscela etereoalcoolica e ho raccolto sul filtro il nuovo precipitato costituito in massima parte da nucleoproteide bacterico.

A questo materiale sciolto a saturazione in una miscela di carbonato sodico al 0.25 per cento (1 parte) e cloruro sodico al 0.85 per cento (3 parti), ho poi aggiunto il siero di animali in preda all'infezione carbonchiosa o immunizzati verso il carbonchio e siero di animali sani.

Come risultato di questo esperimento ho ottenuta la precipitazione del nucleoproteide coi sieri degli animali infetti o immunizzati, mentre non ho ottenuto alcun precipitato adoperando il siero di animali sani.

Queste esperienze dimostrano chiaramente la possibilità di ottenere dai germi delle sostanze precipitabili coi sieri, ciò che è stato, del resto, studiato da altri in rapporto al tifo. Il Paladino (1), per esempio, ha estratto da questo germe una nucleoalbumina, che in presenza dei sieri degli animali viene precipitata dalle soluzioni, ed ha ammesso che la precipitazione avvenga per opera di sostanze, che si liberano dai leucociti.

E ciò lo ha condotto a ritenere che il fenomeno dell'agglutinamento non sia che un processo di coagulazione della nucleoalbumina dei batteri per opera di una sostanza enzimatica prodotta dai leucociti.

Io ho ripetuto le medesime ricerche coi leucociti ottenuti dalla inoculazione di soluzioni alcaline di legumina, secondo il metodo del Rem-Picci (2), ed è ben vero che ho potuto vedere che il liquido, nel quale i leucociti si sono disgregati per mezzo del gelo e del disgelo, precipita la nucleo albumina del carbonchio dalle sue soluzioni, e che i liquidi contenenti i leucociti disgregati provenienti da animali perfettamente sani non hanno quest'azione o la hanno pochissimo spiccata, però non credo che questa esperienza basti a far ammettere l'origine delle sostanze precipitanti dai leucociti poichè esse potrebbero già essere contenute nel liquido nel quale sono sospesi i leucociti. D'altro canto è noto che per converso, altri autori, e in peculiar modo Bordet (3)

---

(1) Riforma medica, 1901-1902.

(2) Giornale delle R. Soc. d'Igiene. Milano, 1901.

(3) Secondo Bordet l'attrazione delle molecole del mezzo liquido verso i batteri, può essere più o meno grande a seconda della sua costituzione. La differenza tra l'attrazione reciproca reale dei bacteri gli uni verso gli altri, e quella verso le molecole liquide, può quindi divenire più o meno manifesta, e spingerli a raccogliersi in ammassi, cioè ad agglutinarsi. Le agglutinine specifiche, unendosi ai batteri, agirebbero anch'esse alterando l'attrazione molecolare tra bacteri e liquido circostante. Seguendo tale concetto, l'agglutinazione sarebbe quindi la risultante di due fattori: da una parte la composizione dei batteri, modificata dalla loro unione con le agglutinine specifiche; dall'altra la composizione del liquido, modificata dalla presenza delle sostanze discioltevi.

Ora tra queste sostanze si è dato moltissima importanza ai sali, e più specialmente al Na Cl. Io però, avendo ripetuto in parte queste ricerche non credo il meccanismo del fenomeno molto semplice.

Ho infatti potuto notare, che quando si prendono patine bacteriche di carbonchio, si lavano e si rilavano in acqua distillata e si dializzano, vengono estratti non soltanto i sali, ma anche notevoli quantitá di nucleoalbumina che fuoriesce per effetto plasmolitico e quindi aggiungendo sieri agglutinanti alle emulsioni, il fenomeno di coagulazione della nucleoalbumina viene quasi del tutto a mancare, e quindi non si percepisce macroscopicamente alcun fenomeno di precipitazione delle medesime.

L'aggiunta di cloruro sodico alle emulsioni dializzate, favorirebbe. a mio avviso, la fuoriuscita della nucleoalbumina per la nota azione plasmolitica delle soluzioni saline, e in particolar modo di quelle di questo sale, per cui l'aggiunta di un siero agglutinante renderebbe percettibile macroscopicamente il fenomeno della precipitazione della nucleoalbumina stessa.

Il Joos, però, trattando coi sieri specifici i suoi bacteri, oltre al fenomeno dell'agglutinamento parla anche, come ultima fase del processo, di batteriolisi, ma io non ho potuto notare alcun fenomeno di batteriolisi nelle soluzioni di nucleoalbumine, mediante l'aggiunta di liquido leucocitico

e Joos (1) hanno data grande importanza, nel meccanismo dell'agglutinazione, alla composizione chimica del liquido e Verney (2) avrebbe persino constatato che l'agglutinazione spontanea può prodursi entro un liquido di composizione determinata.

Ad ogni modo il fenomeno descritto è indipendente da quello di batteriolisi. Infatti il liquido leucocitico che precipita la nucleoalbumina del tifo, agglutina la cultura del bacillo del tifo, ma non produce fenomeni di batteriolisi, e il liquido leucocitico che precipita il nucleoproteide del carbonchio fatto agire su brodo-culture intorbidate, agglutina i bacilli stessi, ma non li batteriolizza.

Occorreva ora, tenendo presenti questi fatti, affrontare lo studio della siero-reazione in rapporto ai similtifi, al tifo, allo *zopfi*.

A tal uopo scelsi il similtifo che mi era servito per gli esperimenti ricordati nella prima memoria, cioè primitivamente gasogeno per H_2S, formanti in gelatina Elsner colonie a piatto, tipicamente nervate, e colonie flagellate in gelatina Piorkowsky, come un vero Eberth, sviluppantesi appena visibilmente sulle patate, capace di filamentarsi enormemente nelle culture su caolino imbevuto di fosfato sodico e somigliante moltissimo, trasportato in culture a base di substrati minerali, al *b. zopfi*.

Questo germe passai per diverse cavie e lo riconobbi del tutto innocuo, salvo il caso in cui lo ricavava da culture anaerobiche nei substrati culturali contenenti le proteine di un tipico Eberth.

D'altro canto scelsi due *b. zopfi*, di cui uno mi feci venire dal laboratorio batteriologico di Kràl, e che io in alcun modo non avrei saputo differenziare dal *b. zopfi*, che aveva studiato precedentemente.

---

specifico. Credo però i risultati dell'A. perfettamente spiegabili, quando invece di estratto leucocitico si adoperi siero di animali immunizzati verso il carbonchio, ossia sieri dotati di potere bactericida più o meno spiccato.

Infatti, esaminando il precipitato batterico che si ottiene indubbiamente dopo un certo tempo d'azione del siero specifico, si notano forme rigonfiate, che lasciano fuoriuscire del materiale, che col bleu di Löffler mostrano l'aspetto di piccoli granulini bleu (cromatolisi nel senso di Gamaleïa); coll'andare del tempo poi molte di esse finiscono anche col trasformarsi in ombre.

E' evidente che in questo caso si aggiunge il fenomeno di bacteriolisi, e che non si tratta di un solo processo biochimico come vorrebbe l'autore.

Quindi, in conclusione, risulterebbe dalle mie ricerche, che la coagulazione e precipitazione delle nucleoalbumine dei bacterii può essere opera di sostanze coagulanti contenute nei sieri o forse nei leucociti, ma questo fenomeno non avrebbe che fare coll'agglutinamento propriamente detto e tanto meno sarebbe seguito da batteriolosi.

(1) Zeitsch. f. Hygiene, 1901.

(2) Annales de l'Inst. Pasteur, 1899.

Questo *b. zopfi* inoculai in cavie e conigli, e gli riconobbi assoluta innocuità, la quale si mantenne anche dopo il passaggio in anaerobiosi nei substrati culturali contenenti i prodotti proteinici del vero b. di Eberth.

Preparai allora grandi patine sviluppatesi su agar del similtifo patogeno e non patogeno, del *b. zopfi* Král e del *b. zopfi* da me isolato, le raccolsi e trattai con il metodo Lustig-Galeotti per la estrazione dei nucleoproteidi del b. della peste, sostituendo la precipitazione colla miscela eteroalcoolica a quella coll'acido acetico. Il precipitato, raccolto sul filtro, lavato, ridisciolto e riprecipitato venne poi definitivamente sciolto nella miscela di cloruro sodico 0.85 % e di carbonata sodico 0.25 %. E su questo liquido venne fatto agire in diverse proporzioni il siero di cavie immunizzate verso il b. di Eberth mediante inoculazione di culture virulente in dosi progressive.

Come risultato di queste ricerche trovai che il siero delle cavie immunizzate precipita tanto il nucleoproteide del b. similtifo quanto quello del *b. zopfi*; però mentre per la precipitazione del nucleo-proteide del *zopfi* necessitava l'aggiunta di 0, 30 cmc. di siero su 1 cmc. di soluzione, per la precipitazione del nucleoproteide del similtifo bastava l'aggiunta di 0, 05 di siero e per lo stesso similtifo patogeno appena 0, 01.

Quest'ultimo risultato faceva credere ad una acquisita specificità dei nucleoproteidi del similtifo dopo il passaggio sui substrati culturali del tifo in anaerobiosi. Cercai quindi di vedere se accadesse lo stesso per il *b. zopfi* messo nelle stesse condizioni di vita. Estratto quindi a caso il nucleoproteide dei due *b. zopfi* coltivati su agar in difetto di ossigeno e in presenza dei prodotti culturali solubili ed insolubili del b. di Eberth e sciolto il nucleoproteide nella sopra indicata soluzione di cloruro sodico e carbonato sodico, vi aggiunsi il siero della cavia sopra indicata (che avevo conservato e che precipitava ancora il nucleoproteide del similtifo patogeno nelle proporzioni di 0, 01 a 1 cmc. cubo di soluzione) ed ottenni la precipitazione del nucleoproteide del *b. zopfi* così trattato, nelle proporzioni di 0, 08 in un caso, di 0, 06 in un altro rispetto a 1 cmc. di soluzione di nucleoproteide.

Ciò posto, rimaneva da vedere in quali proporzioni il nucleoproteide del tifo venisse precipitato dal siero della cavia. Questa ricerca venne ripetuta su due soluzioni di nucleoproteidi di due tifi, l'uno esistente in laboratorio da tempo, l'altro gentilmente inviato dall'Istituto igienico di Monaco. I risultati però furono oltremodo diversi dai precedenti perchè con 1/10 di cmc. di siero mi fu possibile precipitare il nucleoproteide contenuto in 500 e persino 1000 cmc. della soluzione satura, ciò che in altri termini significa che bastavano 0, 002-0, 001 di siero per ottenere un precipitato.

Facendo il controllo con un siero agglutinante di individuo tifoso che agglutinava il b. di Eberth in cultura in brodo di 18h nelle proporzioni di 1 di siero a 78 di cultura dopo 20 minuti a 35°, trovai che questo siero precipitava il nucleoproteide del tifo nelle proporzioni di 0, 009 a 1 cmc. di soluzione, quella del similtifo patogeno nelle proporzioni del 0, 15 e quelle di uno dei *zopfi* dopo i vari passaggi descritti, nelle proporzioni del 0, 90.

Questi risultati, più che convincermi della possibilità di trarre dalla conoscenza del meccanismo sierodiagnostico dei dati importanti per collegare insieme questi germi, *mi condussero a ritenere di non poter contare sul criterio diagnostico come mezzo per identificarli.*

***

Nella prima memoria avevo già fatto notare come i conigli inoculati con il similtifo reso patogeno (dopo il passaggio sui dischi di caolino, presentante molti punti di analogia col *b. zopfi*), potessero fornire un siero oltremodo attivo verso il b. di Eberth tanto da riuscire ad ottenere degli agglutinamenti in proporzioni milionesime. D'altro canto avevo fatto anche notare che il siero degli animali immunizzati verso il b. del tifo era capace di agglutinare lo stesso germe in proporzioni trecentomillesime (1).

Ritornando ora sul mio metodo di sperimentare, ho potuto constatare anzitutto un fatto, che poi altri ha confermato in questo Istituto su larga scala, che cioè il titolo agglutinante del siero di un coniglio è estremamente variabile e che è sufficiente l'inoculazione dei diversi materiali batterici o no per farlo variare, e che bene spesso al fenomeno puro e semplice dell'agglutinamento si aggiunge quello di batteriolisi.

In tal caso la chiarificazione della brodocultura avviene, in proporzioni diluitissime senza per altro che si tratti unicamente del fenomeno dell'agglutinamento.

Ciò premesso, per vedere se al titolo agglutinante del siero dei conigli inoculati col *b. zopfi* potesse darsi valore, ho cercato di studiare se il siero degli animali inoculati con b. Eberth, similtifo e *zopfi* avesse potere bactericida sul *b. zopfi* stesso, e viceversa se il siero di animali inoculati col *b. zopfi* avesse azione battericida sul b. del tifo.

E i risultati sono stati estremamente interessanti perchè ho trovato che coll'inoculazione del tifo, del similtifo, del *zopfi* si eleva di molto il potere battericida del siero di coniglio sul *zopfi* e che

(1) Ricordo che anche altri autori avrebbero trovato agglutinazioni al milionesimo, il Durham, per esempio. Gruber ne ha trovate a 1/600000 (München. med. Woch. 1897), ecc.

lo stesso succede per il siero di conigli trattati col *zopfi*, sul b. di Eberth.

Ciò posto ho scaldati gli stessi sieri a 55°, alla quale temperatura si distruggono i complementi (cercando così nel caso in ispecie di togliere ai sieri le proprietà di distruggere i bacteri) mentre rimangono intatte le sostanze agglutinanti.

Quindi ho saggiato questi sieri sugli stessi germi e ho trovato che il siero della cavia inoculato con tifo ha agglutinato il b. di Eberth nelle proporzioni di 1 di siero a 50 di cultura, e quello inoculato col similtifo nelle proporzioni di 1 a 40. Il siero della cavia inoculata col *b. zopfi* ha agglutinato il *b. tifi* nelle proporzioni di 1 a 10 il siero della cavia inoculato col *b. tifi* non ha agglutinato il *b. zopfi*.

Emerge dunque chiaramente dal fin qui esposto che la proprietà dei sieri di conigli di chiarificare le brodoculture può esser devoluta all'azione battericida del siero, la quale si può provocare nei sieri di questi animali nei più diversi modi senza che in essa entri per poco o per nulla il fenomeno dell'agglutinamento, e che nel caso in ispecie il criterio sierodiagnostico non parlava che in favore della relazione tra il similtifo col b. di Eberth.

Del resto è possibile ottenere anche di far perdere al b. dì Eberth la proprietà di agglutinarsi: il Sacquepée (1) ha ottenuto questo risultato col trattamento mediante i sieri di animali iperimmunizzati, e per quanto ho potuto vedere io, non è più agglutinabile il tifo che si isola da animali fortemente immunizzati (cavie); altri avrebbe trovato lo stesso fatto coltivando i batteri nel siero di animali immuni o immunizzati ed avrebbe spiegato il fatto con la teoria di Ehrlich, ammettendo che i ricettori vadano perduti.

In ogni caso il tifo non è più agglutinabile sotto la forma filamentosa che si ottiene nelle piastrelle di caolino imbevute di soluzioni minerali.

II.

Ricerche sull'azione patogena.

Poichè il criterio sierodiagnostico pareva non condurre a risultati tali da permettere la identificazione del *b. zopfi* con il similtifo ho cercato di approfondire lo studio dell'azione patogena.

Il similtifo più volte ricordato coltivato in brodo Loffler e inoculato sino ad 8 cmc. di brodocultura sia sottocute, sia nel peritoneo delle cavie e dei

(1) Annales de l'Institut Pasteur, XV, pag. 249.

conigli si mostrava sfornito di azione patogena: ripreso per tre volte successive dagli animali (adoperai allo scopo le cavie e mi servii della via endovenosa per le inoculazioni) del pari mantennesi sfornito di azione patogena verso le cavie e i conigli. Notai però forte dimagramento degli animali, il quale però in genere non li conduceva a morte, salvo che non sperimentassi su conigli coccidiosi, che come si sa hanno debolissima resistenza organica.

Coltivato in anaerobiosi senza bollitura precedente dei substrati di nutrizione e senza raggiungere un vuoto corrispondente a un'atm., e da questi substrati passato in altri aggiunto degli estratti nucleoproteidici di un tipico bacillo del tifo patogeno e per cavie e per conigli ed inoculato per la via sottocutanea, dopo quattro passaggi l'ottenni dotato di azione patogena costante per le cavie e per i conigli e incostante quando praticava la inoculazione per la via endoperitoneale. Ripreso dagli animali che morivano coll'inoculazione sottocutanea e passato da animale ad animale dopo cinque passaggi, acquistò notevole virulenza, tanto da uccidere cavie e conigli sia inoculati nelle vene, che nel peritoneo.

Però la dose di brodocultura di tre giorni necessaria per ottenere un risultato mortale era necessario aumentarla almeno del doppio per la inoculazione endovenosa e del triplo o del quadruplo per la inoculazione endoperitoneale.

Il quadro che presentavano gli animali all'autopsia, qualunque fosse la via di inoculazione, non offriva nulla di interessante.

Localmente, negli animali inoculati sottocute, si notava ora sì ora no un arrossamento diffuso, leggera iperemia di tutti gli organi: un po' di ingorgo ghiandolare generale e la milza leggermente ingrossata. Quando l'inoculazione veniva fatta nelle vene ciò che maggiormente attrasse la mia attenzione fu l'ingrossamento e l'iperemia della milza, realmente degna di nota e poi qualche volta un'appariscente iperemia del peritoneo viscerale e delle pleure. Finalmente quando l'inoculazione veniva fatta nel cavo addominale, ebbi a notare il reperto sopra descritto, salvo quello delle pleure che rimanevano normali, poi una evidente iperemia di tutto il peritoneo viscerale: nello stesso cavo peritoneale notai una certa quantità di liquido citrino limpidissimo.

In quanto ai germi inoculati essi erano coltivabili, qualunque fosse stata la via di inoculazione, dalla milza, dal fegato e dalle ghiandole mesenteriche; dal cuore ebbi ora risultati positivi, ora negativi: in ogni caso i reperti positivi più numerosi li ebbi in seguito all'inoculazione endoperitoneale, meno da quelli in seguito all'endovenosa meno ancora in seguito alla sottocutanea.

I germi erano rappresentati da forme lunghe e sottili, appaiate o isolate, bene colorabili, a contenuto non omogeneo, non resistenti al Gram: di forme filamentose nessuna traccia. Coltivati in brodo e saggiati mediante il siero

di tifosi, vennero agglutinati costantemente in proporzioni varianti dall'1 a 50 all'1 a 60 a seconda dei casi.

In quanto al *b. zopfi,* per studiare l'azione patogena negli animali, preparai delle brodo-culture in brodo di Löffer glicerinato, e le inoculai, senza alcun risultato nel peritoneo, agli animali.

Provai anche a coltivare questo germe in brodo aggiunto di sangue sia d'uomo, sia di animale (cavia o coniglio) e poi lo inoculai nel cavo peritoneale o sottocute nei conigli e nelle cavie senza ottenere del pari risultati degni di nota.

Sottoposi allora il germe all'azione della anaerobiosi e poi ripetei le inoculazioni negli stessi animali ottenendo sempre risultati negativi.

Allora posi il germe in sacchetti di collodion dentro il cavo peritoneale di conigli seguendo la tecnica indicata dal Metschnikoff ed adottata dal Vincent per rendere patogeni il *mesentericus*, il *subtilis* e il *megaterium;* ma esso si mantenne del pari sfornito di azione patogena.

Allora pensai di fare ingerire lo stesso germe a delle cavie, dei conigli, dei gatti, ripigliandolo dalle feci e tornandolo ad inoculare a degli animali, ma ebbi sempre un esito negativo.

Soltanto dopo espletati questi tentativi, avendo messo a coltivare il germe nei substrati contenenti i prodotti solubili ed insolubili del similtifo precedentemente descritto, inoculando il *b. zopfi* sottocute dei conigli, riuscii ad ottenere in sito un focolaio ascessuale del quale mi fu possibile isolare e coltivare lo stesso germe e riprodurre coll'inoculazione endoperitoneale una peritonite circoscritta nelle cavie, dal cui pus potei ricoltivare il batterio stesso.

Inoculato ancora questo germe nelle vene dei conigli, si mostrò sfornito di azione patogena.

Quindi è possibile ottenere col *b. zopfi* dei focolai ascessuali (è noto del resto che si può isolare da processi suppurativi) ma niente più di questo (1).

III.

Ricerche sull'azione immunizzante.

Ebbi già occasione di far notare (vedi I Memoria) che inoculando il similtifo e il *b. zopfi* nelle cavie, queste presentavano resistenza notevole al b. del tifo.

(1) Debbo ancora aggiungere che ho praticato ingestioni in cavie, conigli, cani del batterio stesso senza riuscire a determinare alcun fatto degno di nota in questi animali. L'ingestione nell'uomo di tre patine in agar, praticata per tre giorni di seguito, ha sortito lo stesso risultato.

Ritornai quindi su tale risultato indubbiamente esatto, non fosse altro per precisarne il meccanismo.

E poichè nelle esperienze precedenti l'inoculazione immunizzante veniva fatta col similtifo e col *b. zopfi* nel peritoneo delle cavie e quella successiva del b. del tifo nello stesso sito, così criticando adeguatamente tale metodo di sperimento, mi persuasi di provocare con esso nulla più del fenomeno della resistenza artificiale non specifica di Pfeiffer.

Su di essa ha attirato di recente l'attenzione il Wassermann (1), affermando che molti materiali hanno la proprietà di destarla rispetto al tifo e precisamente tutte quelle sostanze a molecole azotate più o meno complicate, tra cui alcune sono state elencate dall'Issaeff.

E che realmente si tratti di questo fenomeno è dimostrato dal fatto che le cavie inoculate nel sottocutaneo con culture di tifo virulento muoiono, pur essendo la dose quella stessa alla quale sopravvivono coll'inoculazione endoperitoneale.

Questi risultati mi parvero così netti da esser inutile di continuare nelle ricerche.

Epperò ritenni che col *b. zopfi* si riescono a salvare le cavie inoculate nel peritoneo, ma tale fenomeno non si deve all'aver provocata in esse l'immunità artificiale, ma semplicemente all'avere destato in esse la resistenza artificiale non specifica.

Viceversa inoculando sottocute culture del similtifo, riuscii dopo 3 o 4 inoculazioni a salvare le cavie dalla inoculazione di brodoculture tifiche in dose mortale e ad ottenere un siero che inoculato in altre cavie (5 cmc. per 200 gr. di gr. di peso) riusciva a salvarle dall' inoculazione sottocutanea di una dose di brodo-cultura tifica assolutamente mortale.

IV.

Ricerche sul termo- e bari-tropismo.

Le ricerche sin qui esposte portavano a concludere che il similtifo, se poteva aver stretti rapporti col bacillo di Eberth, non li aveva certamente col *b. zopfi*.

Per decidere allora se realmente il *b. zopfi* non avesse che vedere col similtifo, pensai di ricercare in questi germi quel partico-

(1) Cfr. anche Issaeff, Zeitschr. f. Hygiene, 1894, e Funk, Soc. R. de Soc. méd. Bruxelles, 1894.

lare modo di comportarsi verso gli stimoli termici che sono stati studiati e descritti per il *b. zopfi.*

Si sa infatti che il *b. zopfi* è un germe che reagisce agli stimoli termici in una maniera speciale.

Il Beyerinck ha infatti potuto notare che regolando opportunamente la sorgente calorifica, si può mutare a piacimento la direzione dei raggi che si sviluppano nei terreni di cultura solidi in cui viene seminato il detto *b. zopfi* per infissione (1).

D'altro canto il Boyre e l'Ewans (2) a proposito di questo germe fanno rilevare la sua grande sensibilità alle gravità.

Notano infatti che le barbe nelle infissioni non si sviluppano in modo simmetrico quando i tubi di gelatina si tengono orizzontalmente come in quelli tenuti in posizione verticale; tenendo i tubi in diverse posizioni dalla verticale all'orizzontale, si ottiene una serie di asimmetrie e di simmetrie; capovolgendo un tubo tenuto verticale, si produce uno sviluppo a piuma che incrocia il preesistente.

Non si ha sviluppo quando si varia l'effetto della gravità sullo sviluppo del batterio e propriamente in modo che il tubo tenuto verticalmente si porti lentamente all'orizzontale, cioè roteandolo una volta al minuto sino ad una volta in un'ora, ecc., ecc.

Tenendo presenti le osservazioni di questi autori, praticai alcune infissioni in gelatina sia del similtifo che del *b. zopfi* e disposi parte dei tubi orizzontalmente, parte verticalmente, parte obbliquamente. E dopo 6–7 giorni osservandone lo sviluppo non potei che confermare le loro osservazioni per il *b. zopfi*, mentre il similtifo non si sviluppava che lungo il tramite d'innesto fatto, qualunque fosse la posizione data al tubo.

D'altro canto ponendo dei tubi seminati per infissione in agar e in gelatina in prossimità di una sorgente calorifica a 21° C. ottenni prevalentemente lo sviluppo di barbe da parte del *b. zopfi* verso la parete riscaldata. Il similtifo non modificò in alcuna maniera il suo sviluppo ordinario.

Quindi anche atteso il risultato di queste esperienze, io mi sento autorizzato a ritenere che il similtifo per quanto in determinate condizioni del suo sviluppo possa presentare punti di analogia col *b. zopfi*, tuttavia non è identificabile con esso: si tratta dunque di due germi differenti.

D'altro canto attesa la parentela morfologica del similtifo con il b. di Eberth, attesa la facilità con cui risente l'azione del siero delle

(1) È tale la sensibilità di questo germe ai differenti gradi di calore, che il Beyerinck lo ritiene adatto a dimostrare le piccole ma costanti differenze di temperatura dei termostati.

(2) Centr. f. B. Bd XV, p. 568.

cavie inoculate di tifo, attesa anche la possibilità di immunizzare con esso gli animali verso il tifo, non esito ad affermare che esso rappresenti lo stesso b. di Eberth in condizione di mancata virulenza, ossia il bacillo del tifo in condizioni di metatrofismo.

Conclusioni.

Il bacillo di Eberth può, coltivato in substrati minerali su blocchetti di caolino, presentarsi prevalentemente sotto un aspetto filamentoso e presentare i caratteri di un similtifo diffuso nell'ambiente.

Questo similtifo, messo nelle stesse condizioni di sviluppo, presenta caratteri che lo riportano alle descrizioni del *b. zopfi*, così come trovasi presentemente descritto.

Col criterio sierodiagnostico, sia usando il siero di cavie infette, sia l'estratto leucocitico tratto dalle medesime, si riesce ad avvicinare il b. di Eberth al similtifo; ma non quest'ultimo al *b. zopfi:* la chiarificazione delle brodoculture è dovuta all'azione battericidica che viene impartita al siero dei conigli, la quale si può provocare in molti modi indipendentemente dal potere agglutinante, senza che abbia alcun che di specifico.

Mentre non è possibile ottenere col *b. zopfi* altro che focolai ascessuali negli animali, è invece possibile rendere patogeno il similtifo come il bacillo del tifo.

Si può determinare nelle cavie la resistenza artificiale non specifica di Pfeiffer verso il tifo mediante l'inoculazione nel peritoneo di culture di *b. zopfi,* ma non si può ottenere l'immunità artificiale: ciò invece è possibile di fare inoculando il similtifo.

Si può ritenere che tutti i caratteri che mettono in correlazione il similtifo col *b. zopfi* e quindi col b. del tifo non abbiano, debitamente vagliati ed interpretati, un reale valore: il *b. zopfi* non è identificabile col b. similtifo, mentre questo si può riportare al b. di Eberth.

Ciò, secondo il trofismo dei germi, sta a significare la possibilità di trovare il b. del tifo nell'ambiente in condizioni metatrofiche, nelle quali esso non è nè virulento, nè agglutinabile: in queste condizioni esso presentasi preferibilmente sotto forma filamentosa.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PISA

Di alcuni nuovi metodi di determinazione dell'umidità delle mura

per il dott. **GINO DE' ROSSI**, aiuto.

La grande importanza della determinazione del contenuto di umidità delle pareti (specialmente in rapporto colla questione della abitabilità delle case nuove) è chiaramente dimostrata dal continuo succedersi di nuovi metodi di ricerca, e giustifica, spero, questa mia breve nota colla quale mi propongo di stabilire lo stato attuale della quistione, esaminando i metodi proposti negli ultimi due anni, giacchè degli altri ho già ampiamente discorso in due mie precedenti memorie sull'argomento. E prendendo appunto le mosse da queste, ricorderò come nella prima (1) io proponevo un metodo di ricerca basato sul principio dell'estrazione dell'acqua della malta per mezzo di alcool assoluto, e col quale, senza determinare la quantità di acqua contenuta nella malta stessa, si stabilisce se essa supera o no una quantità limite ritenuta compatibile colla salubrità delle abitazioni. Pure rimanendo fermi questi concetti fondamentali, il metodo veniva modificato e reso assai più semplice e sicuro nella mia seconda memoria (2), tutto riducendosi al confronto della densità dell'alcool stato a contatto colla malta e filtrato, con la densità dell'alcool adoperato, ed a cui è stata aggiunta una quantità di acqua distillata corrispondente a quella di cui si sarebbe arric-

(1) *L'umidità delle case nuove.* — Questi Annali, vol. IX, nuova serie, fascicolo II, 1899.

(2) *Di un apparecchio per la determinazione del grado di prosciugamento delle case nuove.* — Questi Annali, fascicolo III, 1900.

chito se mescolato (nelle proporzioni stabilite) con una malta contenente la quantità di acqua limite. Ponendo a contatto le due soluzioni idroalcooliche, la seconda delle quali colorata, è facile riconoscere, dal manifestarsi o no di fenomeni di diffusione, in quale rapporto si trovano le rispettive densità.

Nelle due memorie sono esaminate e confutate alcune obiezioni che potrebbero muoversi al mio metodo: si dimostra cioè che *per esso*, nessuna causa di errore deriva dalla variabile temperatura dell'ambiente, da assorbimento dell'umidità dell'aria da parte dell'alcool, da eventuale soluzione nell'alcool di sali contenuti nella malta. Nè da altri gli sono state mosse obiezioni di qualche valore. Momigliano (1) dice che « la filtrazione è *probabile* che non si faccia completa attraverso il cotone di vetro »; ma di fronte a questa che non è che una semplice supposizione sta il fatto che nella mia pratica non ho mai osservato nessun inconveniente riguardo alla filtrazione onde posso asserire che un piccolo batuffolo di fina lana di vetro, discretamente compresso e di non più che 8-10 millimetri di spessore basta per avere una filtrazione perfetta. Casagrandi (2) nota che « nel fare pressione con la pompetta di gomma per far filtrare l'alcool attraverso la malta e il filtro di lana di vetro » il tappo di gomma può saltar via. Questo, che non mi sembra un grave inconveniente, si evita usando un tappo di buona gomma e di forma non conica, ma pressochè cilindrica, e sopratutto non esercitando una pressione molto forte, di cui non v'è punto bisogno. Se, nondimeno, accada, per eccezione, che il tappo salti via, purchè si rimetta subito a posto, ciò non costituisce causa di errore. Quanto all'altra affermazione del Casagrandi che il mio secondo metodo lasci a desiderare in praticità ed esattezza, io, dal canto mio, dopo l'esperienza di ormai più che tre anni, non posso accettarla. E anche nelle ricerche, che più oltre esporrò, ho avuto occasione di ripetere una lunga serie di esperimenti di controllo, ottenendo sempre risultati assolutamente favorevoli senza un'incertezza nè un insuccesso.

Anche il Markl (3) ha proposto una modificazione al suo metodo primitivo (di cui parlo nella mia prima memoria): egli impiega due areometri perfettamente identici, coi quali misura contemporaneamente, nelle medesime condizioni di temperatura, la densità dell'alcool che serve per la ricerca e quella dello stesso alcool stato a contatto colla malta e filtrato, deducendosi dalla differenza delle due indicazioni la quantità d'acqua di cui la malta ha arricchito l'alcool. Come chiaramente dimostra il Ballner (4), la difficoltà di costruzione

(1) *Studio pratico del nuovo metodo del prof. Pagliani per la valutazione dell'umidità dei muri delle case.* — L'ingegnere igienista. Anno II, n. 13, 1901.

(2) *Sui metodi per giudicare dell'abitabilità delle case*, ecc. — Questi Annali XIII, fascicolo II, 1903.

(3) *Ein neuer Apparat für die aräometrische Bestimmung der Mauerfeuchtigkeit.* — Arch. f. Hyg., 1900, Bd. XXXVIII, pag. 367.

(4) *Experimentelle Beiträge zur Methodik der Mauerfeuchtigkeitsbestimmung.* — Arch. f. Hyg., 1900, Bd. XXXVII, pag. 310.

dei due densimetri perfettamente identici e sensibilissimi, l'inconveniente della filtrazione per carta, in ampio contatto coll'aria, da ripetersi più volte per avere un liquido limpido, la necessità di portare il filtrato a 15°, la grande delicatezza della lettura, ed altre circostanze, rendono assai poco pratico questo metodo di Markl. E invero i risultati degli esperimenti di controllo dallo stesso Markl istituiti dimostrano che esso dà luogo a errori tutt'altro che indifferenti. Per es., due campioni di malta che secondo il metodo ponderale di Emmerich contenevano l'1. 88 e il 0. 74 % d'acqua, davano invece col metodo di Markl rispettivamente l'1. 50 e l'1. 00 %, con le differenze tutt'altro che trascurabili del 20 e del 35 %.

Viene ora il metodo di Ballner (loc. cit.) basato sulla asportazione dell'acqua dalla malta per mezzo di anidride fosforica, sostanza avidissima dell'umidità. L'A. pone 15-20 gr. di malta in una capsula di porcellana che mantiene per 48 ore in un essiccatore ove si trova anche un vetrino da orologio con 20 gr. di $Ph_2 O_5$. Le cifre ottenute dall'A. col suo metodo sono un po' inferiori a quelle risultanti dal metodo di Lehmann e Nussbaum. E si noti che in questi esperimenti di controllo l'essiccamento non si è prolungato più di un'ora e mezzo, ciò che, come il Casagrandi ha dimostrato, è affatto insufficiente. È perciò molto probabile che col metodo di Ballner si ottengano valori molto inferiori ai reali: di più, esso richiede molto tempo, e rende necessario l'impiego di un essiccatore per ogni campione di malta: tutto sommato, questo metodo appare poco attuabile in pratica.

Casagrandi (loc. cit.) ha studiato un apparecchio per mezzo del quale fa gorgogliare l'aria di un ambiente in un recipiente contenente alcool di densità nota, e la cui variazione darebbe la quantità di acqua assorbita e quindi il contenuto percentuale di acqua dell'aria dell'ambiente. L'A. stesso, confermando in tutto e per tutto le mie precedenti ricerche, ritiene fallaci e malsicuri i metodi di ricerca dell'umidità delle abitazioni basati sulla determinazione dell'umidità dell'aria degli ambienti: dopo di che non mi sembra dover seguire l'A. nel rilevare, come egli stesso fa, gli altri minori difetti e le imperfezioni del metodo in questione. In secondo luogo, Casagrandi propone una modificazione al mio primitivo apparecchio, coi galleggianti. Per evitare, come già ho detto, la possibile sfuggita del tappo dal tubo di vetro ove si fa la mescolanza della malta e dell'alcool, lo sostituisce con un grosso recipiente metallico armato di rubinetti e chiavarde, che io ritengo non necessario.

Del resto, questo primo metodo è per me assolutamente inferiore al secondo soprattutto per la difficoltà di costruzione dei galleggianti, per la necessità di preparare l'alcool di un determinato peso specifico, e per una certa instabilità di risultato giustamente rilevata dal Casagrandi.

Finalmente il Casagrandi ha perfezionato l'apparecchio di Lehmann e Nussbaum, rendendolo più solido e più pratico, colla sostituzione di un ma-

nicotto di ottone al tubo di vetro in cui questi AA. pongono le navicelle col materiale da essiccare.

Ho lasciato per ultimo, sebbene tale non sia cronologicamente, il metodo di Pagliani (1) come quello che indubbiamente si presenta con le migliori apparenze di esattezza, rapidità e facilità di esecuzione. In un filtro a ditale, tenuto in apposito pesafiltri, il tutto previamente seccato e pesato, si raccoglie il materiale che, dopo una nuova pesata, si versa in un mortaio, aggiungendovi alcool assoluto e pestando ben bene. Quindi si rimette il materiale coll'alcool nel ditale posto in apposito portafiltri: si ripete la filtrazione fino ad ottenere l'alcool perfettamente limpido, e finalmente si pone il filtro col materiale in una stufa ad essiccamento e si ripesa, un'altra volta, nel suo primo pesafiltro, il filtro col materiale così trattato. La differenza in peso è data dalla perdita di acqua subita dal materiale per azione dell'alcool. Il dott. Momigliano che ha eseguito ricerche di controllo in paragone col metodo di Nussbaum, ha trovato che col metodo di Pagliani si ottengono cifre alquanto più alte, ciò che si dovrebbe attribuire al fatto che il materiale non venendo mai in rapporto coll'aria ambiente del laboratorio, conserva completamente la quantità di acqua che conteneva, mentre ne perderebbe col metodo di Nussbaum durante la sua triturazione e la sua pesata all'aria.

Anch'io ho voluto eseguire numerose ricerche di controllo, in paragone col metodo di Glässgen. Ma mi sono dovuto accorgere ben presto che, all'atto pratico, il metodo di Pagliani, pur dando risultati esatti, non è poi di esecuzione così semplice e rapida come sembra a prima vista. Prima di tutto, per ottenere la completa eliminazione dell'alcool l'essiccamento deve essere assai prolungato, e cioè per un periodo di tempo non molto inferiore a quello richiesto dal metodo di Glässgen. Riesce poi piuttosto difficile la raccolta sul filtro del materiale stato a contatto coll'alcool, poichè rimane in fondo al mortaio una polvere finissima a raccogliere la quale sono necessarie lunghe manovre e una grande quantità di alcool: e non sempre si evita una certa dispersione del materiale.

Io preferisco evitare il trituramento nel mortaio, regolandomi nel modo seguente.

Nel ditale tenuto nel pesafiltri, pongo il materiale già triturato e preparato secondo il solito (e queste manipolazioni, come più oltre dimostro, non possono costituire una rilevante causa di errore) e dopo aver pesato il tutto riempio di alcool assoluto il pesafiltri che viene chiuso col suo tappo e lasciato in riposo per un'ora o più. Allora pongo il ditale sul portafiltri facendovi filtrare attraverso l'alcool, e continuo nel modo solito. In ogni modo

---

(1) *Nuovo metodo di determinazione dell'umidità delle pareti delle case.* — Rivista d'igiene e san. pubb., 1° luglio 1901, pag. 469. — Cfr. anche la già citata memoria di Momigliano.

è necessario prolungare assai l'essiccamento: il peso costante, anche contentandosi del centigrammo, come prescrive Pagliani, non lo ho quasi mai ottenuto se non dopo tre essiccamenti a 100° di 1 ora e mezza ciascuno. Contuttociò essendo i risultati (secondo si desume dalla Tabella I) molto concordanti con quelli ottenuti col metodo di Glässgen, ed essendo nel complesso assai più semplice di questo, il metodo Pagliani può utilmente adottarsi quando si voglia conoscere il contenuto di acqua delle mura.

Noto che nella Tabella I come in tutte le altre si tiene conto anche dei risultati ottenuti col mio metodo avendo voluto approfittare di questa larga rassegna di saggi, per eseguire un nuovo e definitivo controllo di esso.

TABELLA I. — *Esperienze di controllo dei metodi di Pagliani e De Rossi in confronto col metodo di Glässgen.*

Num. d'ordine	PROVENIENZA del materiale		Acqua % in grammi riconosciuta: col metodo di Glässgen	Acqua % in grammi riconosciuta: col metodo di Pagliani	Metodo De Ross [A = contenuto di acqua infer. all'1.5 %, B = contenuto di acqua sup. all'1.5 %].
1	Intonaco di una vecchia parete dell'Istituto d'Igiene.		2.58	2.56	B
2	Intonaco di un'altra parete		1.56	1.41	A
3	Id.	id.	0.78	0.78	A
4	Muro costruito di recente nell' Istituto d'Igiene.	Intonaco superficiale . .	1.15	1.23	A
5		Malta profonda	1.20	1.32	A
6		Mattone	0.90	0.99	A
7	Malta dell'intonaco e interstiziale di vari ambienti di una casa di antica costruzione.	Cantina	3.96	4.00	B
8		Piano terreno	2.80	2.66	B
9		Id. (altro ambiente) . .	1.04	1.08	A
10		Primo piano	1.20	1.36	A
11		Id. (altro ambiente) . .	0.65	0.65	A
12		Secondo piano	0.80	0.92	A
13		Id. (altro ambiente) . .	1.48	1.54	B
14		Soffitta	1.12	1.20	A
15	Casa costruita da un anno, pareti intonacate da 4-6 mesi.	Parete esterna a nord, piano terreno. — Int°. supf.	1.72	1.86	B
16		Parete esterna a nord, piano terreno. — Malta profonda	1.50	1.38	B
17		Parete esterna a sud, piano terreno. — Int°. supf.	1.10	1.20	A
18		Parete esterna a sud, piano terreno. — Malta profonda	1.02	1.06	A
19		Parete interna, primo piano. Malta superf. e profonda	1.44	1.48	A

***

Prima di concludere riguardo ai metodi da preferirsi nella determinazione dell'umidità delle case, e nello stabilire la loro abitabilità, mi è sembrato che mettesse conto di chiarire due punti assai

importanti della tecnica relativa e che sono comuni a tutti quelli (e sono, come si sa, i soli attendibili) basati sulla ricerca del contenuto di acqua delle mura.

Innanzi tutto, la ricerca eseguita sulla malta che costituisce l'intonaco e che si trova negli interstizi a cementare gli altri materiali, dà realmente risultati esatti? Il contenuto di acqua delle pareti prese nella loro totalità corrisponde al contenuto di acqua della malta? Nei primi lavori di Glässgen e di altri, eseguiti nel laboratorio di Pettenkofer, si afferma che coll'esame della malta si può stabilire con sicurezza il grado di prosciugamento delle costruzioni recenti (1), ma in ogni modo non sembrava superfluo che da noi, in così diverse condizioni di clima, di tecnica edilizia, ecc., si facesse qualche ricerca in proposito.

Ho perciò preso in esame il materiale delle mura di edifizi di recente costruzione e di case vecchie, determinandone il contenuto di acqua dell'intonaco, della malta degli interstizi più profondi, dei mattoni che generalmente costituiscono la massa più cospicua delle mura, e degli altri materiali (calcarei, silicei, ecc.), che capitavano nel punto preso in esame. La ricerca veniva fatta col metodo classico di Glässgen (lievemente modificato, secondo che indico nella mia prima memoria, per potere eseguire contemporaneamente 4 ricerche) che resta sempre il metodo migliore fra tutti quelli per pesata, indubitabilmente il più esatto ed anche assai semplice solo che si abbia a disposizione un piccolo gassometro e qualche torretta. Contemporaneamente, secondo ho già accennato, eseguivo la ricerca di controllo col mio metodo.

---

(1) Cfr. NUSSBAUM. *Ein Beitrag zu den Trockenheitsverhältnissen der Neubauten.* Archiv f. Hygiene, 1893. Bd. XVII, p. 17.

TABELLA II. — *Determinazione del contenuto di acqua dei varii materiali costituenti le mura, eseguita col metodo di Glässgen. — Controllo del metodo De Rossi.*

Num. d'ordine	PROVENIENZA DEL MATERIALE			Acqua % in grammi riconosciuta col metodo di Glässgen	Metodo De Rossi [stesse indicazioni della Tabella I]
1	Stanza a piano terreno esposta a Sud. Parete interna a Nord, costruita da vecchia data con mattoni e calce. La parete fu demolita temendosi che fosse umida, per infiltrazioni da un condotto lurido. I mattoni, in due diverse località, si presentavano con due tinte affatto diverse.		Intonaco superficiale.	0. 51	A
2			Malta presa profondamente.	1. 93	B
3			Mattone di colorito chiaro.	0. 08	A
4			Mattone di colorito rosso scuro.	4. 34	B
5	Stanza a piano terreno esposta a Sud. Parete esterna a Nord, esposta molto alle pioggie.		Intonaco superficiale.	1. 13	A
6			Malta presa profondamente.	2. 68	B
7			Mattone	0. 63	A
8			Arenaria	5. 61	B
9	Locale nell' Istituto d' Igiene costruito da un anno: pareti esterne.	Parete a Nord	Intonaco superficiale.	1. 12	A
10			Malta presa profondamente.	2. 40	B
11			Mattone	0. 37	A
12		Parete a Sud	Intonaco superficiale.	1. 32	A
13			Malta presa profondamente.	2. 27	B
14			Mattone	0. 63	A
15			Macigno	0. 20	A
16	Locale di vecchia costruzione nell'Istituto di Igiene esposto a Sud. Parete interna. Saggi presi a lieve distanza l'uno dall'altro, in due punti ove l'intonaco aveva colorito differente	Intonaco di colorito più chiaro.	Intonaco superficiale.	0. 78	A
17			Malta presa profondamente.	2. 58	B
18			Mattone	2. 33	B
19			Macigno	0. 11	A
20		Intonaco di colorito più scuro.	Intonaco superficiale.	3. 13	B
21			Malta presa profondamente.	3. 25	B
22			Mattone	1. 12	A
23			Calcare semi-cristallino.	0. 07	A
24			Calcare schistoso. .	0. 38	A

Segue Tabella II. — *Determinazione del contenuto di acqua dei varii materiali costituenti le mura, eseguita col metodo di Glässgen. — Controllo del metodo De Rossi.*

Num. d'ordine	PROVENIENZA DEL MATERIALE			Acqua °/₀ in grammi riconosciuta col metodo di Glässgen	Metodo De Rossi [stesse indicazioni della Tabella I]
25	Casa costruita da 7 mesi, intonacata da 3 mesi (aprile-giugno)	Parete esterna a Sud di stanza al primo piano.	Malta superficiale e profonda.	1.80	B
26			Mattone	0.36	A
27		Parete interna della medesima stanza al 1° piano.	Intonaco superficiale.	1.89	B
28			Malta presa profondamente.	2.06	B
29			Mattone	0.23	A
30	Parete interna, costruita e intonacata da circa 1 anno.		Intonaco superficiale.	0.80	A
31			Malta presa profondamente	0.96	A
32			Mattone.	0.26	A
33			Macigno.	0.08	A
34			Calcare schistoso	0.40	A

Risulta evidente dalla Tabella II, che la malta che costituisce l'intonaco e specialmente quella che cementa i materiali è quasi sempre l'elemento più ricco di acqua, sempre addirittura, nel caso degli edifizi di recente costruzione. I mattoni che nelle case vecchie hanno un contenuto molto variabile di acqua, ne sono, negli edifizi nuovi, assai meno ricchi che non la malta. Gli altri materiali risultano in genere poverissimi di acqua, eccezione fatta di un'arenaria che appare sommamente igroscopica. Quindi la determinazione dell'umidità della malta superficiale e profonda, è sufficente per la ricerca dell'abitabilità delle case nuove: può eventualmente ammettersi nel campione anche qualche frammento di mattone, se non che, essendo questo materiale assai compatto richiede di essere pestato assai a lungo derivandone una esposizione all'aria assai prolungata, che deve possibilmente evitarsi.

Questo appunto è il secondo particolare di tecnica che volevo toccare: quello cioè dell'eventuale perdita di acqua da parte del materiale, durante le operazioni di sminuzzamento e di stacciamento

richiesto da tutti i metodi in questione, compreso quello di Pagliani se si voglia accettare la modificazione da me proposta. Ho istituito dunque una serie di ricerche, determinando il contenuto di acqua della malta o dei mattoni subito appena raccolti e preparati i saggi e dopo variabili intervalli di esposizione all'aria.

Tabella III. — *Variazioni del contenuto di acqua della malta e dei mattoni per l'esposizione all'aria. — Controllo del metodo De Rossi.*

Num. d'ordine	PROVENIENZA DEL MATERIALE	e durata dell'esposizione all'aria	Acqua % in grammi riconosciuta col metodo di Glässgen	Metodo De Rossi [solite indicazioni]
1	Intonaco di una parete a pianterreno costruita da un anno e intonacata da 6 mesi.	Ricerca immediata	1.16	A
2		Dopo esposizione all'aria, in strato sottile per 10'	1.16	A
3		Dopo esposizione all'aria, in strato sottile per 45'	1.09	A
4		Dopo esposizione all'aria, in strato sottile per 1 ora e 30'	1.04	A
5	Mattone della medesima parete.	Ricerca immediata	0.38	A
6		Dopo 10'	0.36	A
7		Dopo 30'	0.31	A
8	Intonaco e malta profonda di una parete costruita da 6 mesi.	Ricerca immediata	1.84	B
9		Dopo 15'	1.78	B
10	Malta di una vecchia parete	Ricerca immediata	0.66	A
11		Dopo 10'	0.59	A
12		Dopo 1 ora	0.52	A
13	Intonaco di una parete a pianterreno, costruita da sei mesi, intonacata da 2 mesi.	Ricerca immediata	5.85	B
14		Dopo 10'	5.60	B
15		Dopo 30'	5.38	B
16		Dopo 1 ora	4.88	B
17	Mattone della medesima parete.	Ricerca immediata	4.02	B
18		Dopo 10'	3.80	B
19		Dopo 1 ora	3.10	B

Le ricerche furono eseguite durante il mese di giugno, in giornate asciutte, e con temperatura oscillante tra 24° e 30° C. Si vede (Tabella III) che l'esposizione all'aria è tutt'altro che indifferente

se assai prolungata; ma solo dopo 15′ le modificazioni del contenuto di acqua cominciano a farsi rilevanti. E se si pensa che le operazioni di pestamento, di stacciamento e di pesata, si eseguono agevolmente in 2 o 3 minuti, se ne conclude che la perdita di acqua in seguito ad esse non può costituire una causa di errore di cui ci si debba preoccupare.

***

In conclusione lo stato attuale della questione del giudizio di abitabilità delle case nuove può così riassumersi:

1. Il criterio di abitabilità delle case nuove non può dedursi se non dai metodi atti a rilevare il prosciugamento dei materiali che le costituiscono, e specialmente della malta che costituisce l'intonaco e che cementa gli altri materiali, la quale ha un contenuto di acqua non mai inferiore, nelle case nuove, agli altri costituenti la compagine delle mura.

2. La malta, dopo raccolta, deve essere accuratamente preservata dal contatto dell'aria esterna: però le manipolazioni necessarie per le preparazione del saggio non danno luogo a una perdita di acqua che possa costituire una apprezzabile causa di errore.

3. Quando si voglia conoscere il contenuto di acqua della malta il metodo preferibile a tutti per esattezza e sicurezza di risultato, è sempre quello di Glässgen che può leggermente modificarsi permettendo di eseguire contemporaneamente quattro ricerche. Il metodo di Pagliani, con qualche modificazione, è quello che può meglio sostituire il metodo di Glässgen, inquantochè pur non rappresentando una notevole economia di tempo, non richiede l'uso di apparecchi di laboratorio, ed è molto esatto.

4. Quando si ritenga bastevole lo stabilire il criterio di abitabilità in base ad un valore limite da determinarsi sperimentalmente in ogni località (1. 5 per cento per Pisa secondo de' Rossi; 3 per cento a Milano secondo Coggi (1); dal 2 al 3 per cento a Roma secondo Casagrandi), allora il mio metodo è da raccomandarsi per esattezza e sicurezza di risultato, per facilità e rapidità di esecuzione.

Pisa, luglio 1903.

---

(1) *Ricerche relative all'umidità delle case di Milano.* — Giornale della R. Soc. Ital. d'igiene, XXIII, 1901, pag. 337.

Istituto d'igiene della R. Università di Roma

Ricerche sulla carne frolla dal punto di vista batteriologico e chimico

per il dottor **O. CASAGRANDI.**

Introduzione.

È noto che le carni degli animali mattati, vengono generalmente messe in vendita quando sono divenute frolle.

Le ricerche speciali sulla frollatura delle carni sono però ben poche, sicchè oggi come nel 1893 si può ancora dire col Fiorentini che « quel poco che si sa si è obbligati a ricercarlo in lavori compiuti per risolvere un altro tema più vasto, quello cioè delle fermentazioni putride delle sostanze organiche, nel quale è incluso quello della frollatura ».

Il primo lavoro di qualche interesse sulle carni frolle si deve appunto al Fiorentini (1), il quale a me pare sia riuscito specialmente a precisare i caratteri microscopici coi quali è lecito distinguere la carne nel periodo intermedio tra la rigidità cadaverica e la putrefazione.

Egli dice: « la carne frolla, microscopicamente, appare floscia, lavata, ed esala un odore di fermentato il quale però non è ancora fetido. L'aroma proprio delle carni (osmazoma) si sviluppa meglio, e colla cottura si mette in libertá.

Al microscopio la struttura fondamentale della fibra si altera; e, secondo l'A. i caratteri istologici delle fibre muscolari frolli sono abbastanza netti, tanto da poterli distinguere da quelli delle fibre muscolari fresche e in incipiente putrefazione.

« Nel primo periodo (muscolo fresco) il carattere chè tutte le fibre muscolari presentano è un grado di elasticità ben marcato tanto che resistono a trazioni abbastanza forti da permettere un facile isolamento di esse senza che ne derivino lacerazioni; così i preparati del muscolo fresco, sono costi-

(1) *La frollatura delle carni.* Giorn. R. Società Igiene di Milano. Anno XV.

tuiti da fibre lunghe ben conservate. Il sarcolemma ed il contenuto della fibra sono molto trasparenti e gli strati (mono e birifrangenti) sono netti ma poco apparenti. I nuclei sono pure chiari e contengono nucleoli; attorno al muscolo e sopra tutto ai poli, esiste sempre uno strato di protoplasma granuloso che si vuole considerare come avanzo di protoplasma primitivo.

Nel secondo periodo (rigidità cadaverica) la fibra ha ridotto in gran parte il suo indice di elasticità, di modo che essa sembra più compatta ma altresì più friabile, e contro un corpo resistente facilmente si spezza.

Nelle preparazioni riesce quindi difficile per le ragioni sopra esposte, ottenere lunghe fibre. Un carattere costante che si osserva nella rigidità è che la fibra, pur rimanendo trasparente, mostra molto più chiaramente le sue striature, le quali sono più visibili di quanto non lo siano nel primo stadio a muscolo fresco.

Nel terzo periodo (frollatura) la fibra ha perduto la sua elasticità in questo senso, che offre nessuna resistenza ai corpi che la toccano e facilmente il suo protoplasma si spappola e si scinde entro il sarcolemma, il quale però conserva ancora un certo grado di resistenza e di elasticità, tanto da resistere a quelle pressioni che cogli aghi gli si imprimono nella preparazione.

Gli strati mono e birifrangenti tendono a scomporsi, a ridursi in forme fibrillari e granulose le quali ultime ricordano i sarcoelementi di Bowmann.

In questo stadio, come si comprende facilmente, riesce difficile ottenere coi mezzi dell'agitazione e della dilacerazione fibre separate di una certa lunghezza; ma sono quasi tutti frammenti di fibre riunite da una maglia finissima di perimisio ed endomisio che le avvolge e che a sua volta è divenuta come gelatinosa. I nuclei del sarcolemma sono pochissimo visibili anche col concorso dei reagenti speciali ed il protoplasma della fibra è in gran parte opaco. »

CAP. I.

Ricerche batteriologiche.

La causa della frollatura è legata, secondo la maggioranza degli autori alla produzione degli acidi lattico, formico, e del fosfato acido di potassio, per opera di processi fisico-chimici e secondo il Fiorentini per opera generalmente di microbi.

Per risolvere nel miglior modo la quistione, ho voluto praticare alcune ricerche sulla musculatura di cani e di conigli e di cavie.

A tal uopo, depilavo accuratamente con la pasta al solfidrato di calcio le coscie di questi animali, poi le lavavo accuratamente con acqua sterilizzata; indi li uccidevo, e subito, appena uccisi, immergevo gli arti in una soluzione di sublimato all'1 per cento e dopo in un vaso contenente acqua bollita calda, poi con una grossa forbice a branche robuste sterilizzate al

calore rosso direttamente alla fiamma, recidevo l'arti che ponevo subito in apposita camera a vetri, precedentemente sterilizzata, nella quale era possibile operare in ambiente assolutamente privo di germi e senza che il pezzo venisse in contatto con l'aria esterna.

Tale camera (fig. I) ha la forma di un parallelepipedo alto cm. 53, largo cm. 50 e lungo cmc. 45: il fondo è di legno, le pareti anteriore, laterali e superiori sono costituite da telai pure di legno forniti di vetri, la posteriore è divisa in due metà nel senso della larghezza: la metà superiore è costituita da un telaio a vetri, l'inferiore da uno sportello fornito di due aperture attraverso le quali si possono introdurre le mani e l'avambraccio. A proteggere poi l'interno della cassetta dall'introduzione dell'aria attraverso



Fig. I.

queste aperture, al bordo delle medesime sono attaccate due maniche di stoffa impermeabile, le quali portano al loro estremo un elastico, di maniera che quando in esse si introduce la mano, la manica viene ad aderire al polso dell'operatore.

Il soffitto della camera è mobile a *coulisse*, di modo che si può togliere, e dopo toltolo è possibile levare la parte della parete posteriore fornita di vetro, poichè anche essa è mobile a *coulisse* lungo le guide (C, D).

Naturalmente per chiudere la camera, se si toglie questa parte della parete posteriore, bisogna introdurre il soffitto orizzontalmente appena al disopra dello sportello sino ad accostarsi al vetro del telaio anteriore a cui si fa aderire per mezzo di ovatta. Quando si adoperi la cassetta non ridotta

(ciò che si fa quando si voglia utilizzare maggior spazio in altezza), l'operatore deve guardare attraverso il telaino della parete posteriore; quando invece si adoperi la cassetta ridotta l'operatore può, attraverso la parete superiore, osservare le manovre che fa colle mani nell'interno della cassa.

Nell'interno, attraverso un buco praticato in uno dei telai e fornito di ovatta, si introduce un tubo di gomma per la lampada a gas oppure ci si serve di una semplice lampada ad alcool che si pone entro la cassetta. In questa si introducono poi, aprendo lo sportello o l'apertura posteriore, gli oggetti necessari, mortai, forbici, tubi, ecc., e nel fondo si colloca sempre una lastra di vetro.

Le pareti della camera, e così il fondo, si lavano con una soluzione di sublimato, e poi per mezzo di un foro praticato in uno dei telai si mette in comunicazione con una stufa ad acqua e preferibilmente con un autoclave, in modo da introdurci dentro del vapore a una temperatura sufficiente (80° C) per uccidere i germi che eventualmente possano essere sospesi nell'aria.

Gli oggetti devono porsi nella camera sterili anche all'esterno e quindi si avvicinano allo sportello (E) aperto. Se si tratta di capsule, di tubi, di bocce, di mortai coperti con carta bibula, e mentre funziona il getto del vapore acqueo, si toglie la carta bibula, e subito si pongono dentro; se si tratta di strumenti, in recipienti contenenti acqua bollente, ecc.

Così pure il pezzo da tagliare deve porsi dentro, dopo disinfettato e lavato, mentre funziona il getto del vapore acqueo (1).

Per il caso mio ho sempre adoperato la cassetta a metà altezza, cioè col soffitto dalla posizione A, B, C, D, nella posizione A^1, B^1, C^1, D^1 (fig. I). Ponevo dentro alla stessa forbici, bisturi, pinze in bacinella di ferro smaltato contenente acqua bollente, poi ovatta in un recipiente di rame uscente nel momento dalla stufa a secco e quindi ancora molto caldo, una lampada a gas, di cui il tubo di gomma, sterilizzavo con sublimato e la lampada direttamente ad una fiamma, capsule di Petri, della garza giá tagliata e sterilizzata nella stufa di Koch; dei tubi da saggio a diametro piuttosto grande sterili; e dei recipienti a doppia tubulatura simili a quelli per il lavaggio dei gas, già sterilizzati e con le due branche dei tubi a bolla, pieni di cotone ben compresso.

Quindi facevo agire il getto di vapore per dieci minuti, stirando bene le maniche in fuori, dimodochè il vapore potesse uscire per i loro due fori, i quali frattanto lavava con sublimato.

Dopo di ciò introducevo l'arto, pulito nel modo già detto, interrompevo il getto del vapore, infilavo le mani, lavate accuratamente in sapone, sublimato e acqua bollita, e alcool, nelle maniche, e le introducevo attraverso l'apertura dello sportello nell'interno della cassetta. Dopo di che pulivo i vetri opacatisi con ovatta bagnata in sublimato (posto in una bacinella dentro la cassetta stessa) e poi passavo a prelevare i pezzetti di carne.

---

(1) Mi sono anche servito per sterilizzare la camera della formalina; ma è molto incomodo l'odòre della stessa, perchè sempre un poco sfugge dalle commessure. D'altro canto sostituendo aria filtrata attraverso del cotone, per togliere i vapori racchiusivi, quando poi si apre lo sportello per introdurre gli oggetti non si è sicuri che non penetrino dei germi coll'aria che si rinnova.

A tal uopo con un bisturi infuocato tagliava la pelle e poi con un altro bisturi la scollavo e con altre forbici, bisturi e pinze, messa a nudo la muscolatura, ne asportavo dei pezzetti piccolissimi.

Di questi ne ponovo un certo numero entro i tubi per l'altezza di un centimetro, chiudendoli parte con l'ovatta sterile, parte semplicemente con garza, mettendo alcuni di questi entro i recipienti simili a quello per il lavaggio dei gas.

Dopo di che estraevo dalla cassetta sia i tubi chiusi con ovatta sia quelli semplicemente chiusi con garza e posti nei barattoli sterili.

Ponevo quindi la branca più corta dei barattoli in comunicazione con una pompa d'aspirazione e lasciavo che l'aria passasse.

Dopo 1-10 giorni toglievo un tubo e con tutte le cautele dal centro del pezzetto di muscolo (operando sempre entro la cassetta) facevo culture e prelevavo piccoli campioncini per fare preparati microscopici a fresco e colorati.

Le stesse ricerche facevo poi su pezzetti di muscolatura chiusi nelle provette tappate con ovatta.

Da 15 pezzi di muscolatura (1) della coscia di cani, conigli, cavie e polli (dopo avere acquistata sufficiente pratica nella tecnica), posti nei tubi chiusi con garza, nelle bocce a lavaggio, non ho ottenuto lo sviluppo di alcun germe; mentre le carni poste in tubi di controllo, sempre chiusi con garza, ma lasciati nell'ambiente per lo stesso tempo erano invase da germi. Infatti lavando queste carni con 10 cmc. di acqua distillata sterilizzata e poi ponendo un cmc. di quest'acqua di lavaggio in una capsula di Petri, e versandovi sopra l'agar sterile fluidicato, ottenni lo sviluppo di colonie da tutti i tubi ora più ora meno numerose, come risulta dal seguente quadro:

---

(1) Queste carni, all'esame microscopico, presentavano i caratteri delle carni frolle. Avevano reazione debolmente acida.

Numero delle colonie sviluppatesi nelle piatte di agar da 1 cmc. dell'acqua di lavaggio della carne contenuta nelle provette.

CARNE di	I	II	III	IV	V	VI
Cane	8	50	11	7	35	27
»	7	9	21	31	14	3
»	7	51	2	7	33	109
»	12	69	310	49	51	76
Coniglio	91	63	15	21	7	103
»	4	55	33	21	10	60
»	59	71	15	29	73	79
Pollo	106	169	36	43	59	131
»	131	121	10	6	90	31
»	33	37	45	12	71	10
Cavia	13	26	29	72	55	43
»	49	55	76	24	12	61
»	27	10	21	9	7	56
»	21	15	84	69	73	75
»	4	9	51	21	111	99

Del resto anche nelle prime esperienze che feci (28), non ottenni dalle carni chiuse nei recipienti a lavaggio che 1-2-5 colonie e una sola volta 7 colonie. E i germi trovati furono: la *sarcina lutea*, il b. *vulgare*, il *b. subtilis*, il *b. dendriticus*, il *b. zopfi*, il *micr. candicans*, ossia tutti germi dei più banali, e dei più comuni nell'aria.

È dunque evidente che le carni diventano frolle senza il bisogno di germe alcuno, e che la frollatura, avviene più presto nelle carni poste in ambienti in cui l'aria (sterile) viene rinnovata che in ambienti in cui gli scambi atmosferici sono impediti.

Se però la frollatura delle carni è un processo indipendente dalla presenza di microbi, non è men vero che per poco che le carni si lascino all'aria, molti sono i germi che le invadano percui da qualunque carne frolla, si può finire coll'isolare i più diversi rappresen-

tanti delle batteriacee, e degli ifomiceti come ha dimostrato il Fiorentini, senza però che ciò autorizzi ad attribuire a tali germi l'importanza di agenti di una frollatura microbica.

CAP. II.

Ricerche chimiche.

Della questione, gli autori se ne sono occupati solo per distinguere le carni putrefatte ed è specialmente alla quantità di alcali che hanno dato importanza. Il Tusini (1) per es., di recente ha concluso che « la determinazione quantitativà delle basi volatili messa assieme ai caratteri fisici ed organolettici, è per ora l'unico mezzò scientifico per decidere dell'alterazione delle carni sia fresche, sia conservate. »

Antecedentemente al Tusini, il Mai (2) si era però occupato dei modi per riconoscere le carni putrefatte quando il processo di putrefazione è appena iniziato. Fatto notare che la ricerca dell'indolo e dello scatolo, delle ptomaine è inutile perchè tali sostanze si rinvengono già quando la putrefazione è talmente avanzata che non occorre più l'intervento del chimico per constatarle, aveva osservato che la ricerca quantitativa dell'ammoniaca per sè sola non è sufficiente, perchè le proporzioni dell'ammoniaca normale ed anormale subiscono notevoli oscillazioni.

Il dato più attendibile secondo il Mai si ricaverebbe dal rapporto tra l'azoto totale e l'ammoniaca.

Egli dice: « l'analisi quantitativa dell'ammoniaca per sè sola non può considerarsi come misura della putrefazione poichè tanto le quantità dell'ammoniaca normale, quanto quelle che si originano nella putrefazione subiscono notevoli oscillazioni. Queste ultime al cominciare della putrefazione crescono, poi diminuiscono e più tardi ricrescono.

Più attendibile è invece il rapporto tra ammoniaca ed azoto totale il quale sembra costante in una stessa quantità di carne. Così ad es.; nel fegato fresco di manzo l'azoto totale è di 3, 1 °/$_0$ e l'ammoniaca è di 0. 32 °/$_0$. Quest'ultima dopo 4 giorni sale a 9. 42 °/$_0$ (?).

Nei visceri freschi dei suini l'azoto totale è di 2. 2 °/$_0$, l'ammoniaca di 0. 22 °/$_0$ e dopo tre giorni sale a 0. 35 °/$_0$.

---

(1) *Le stazioni agrarie ital.* 1902, p. 915.
(2) *Zeitschr. d. Nahrungs-und Genuss-mittel.* Bd. IV, 1901.

Sicchè la quantità di ammoniaca che nelle carni fresche rappresenta circa il 10 % di azoto totale, dopo 3-4 giorni è considerevolmente aumentata.

Parrebbe quindi secondo il Mai, che finchè il rapporto tra azoto ed ammoniaca rimane costante, nessun fatto di putrefazione possa ritenersi iniziato; quindi a volerne trarre delle deduzioni in rapporto alle carni frolle, dato che fosse esatto ciò che afferma il Mai, le carni sino a che il rapporto rimane immutato si troverebbero nel periodo di frollatura.

Stando così le cose ho voluto vedere come variasse, il rapporto tra azoto totale espresso in ammoniaca, e l'ammoniaca, contenuti in 100 parti di carne, nelle carni che si trovano nelle rivendite e che quindi si presupporrebbe fossero nello stato di frollatura, di fronte a quelle fresche, di animali da poco macellati, e di fronte a quelle putrefatte.

Nello stesso tempo non ho voluto perder di vista la perdita in peso delle carni, opportunamente essiccate, stabilendo altri rapporti

A. Tecnica seguita.

Come primo saggio di esperienze, ho studiata la carne di manzo, sia appena macellata, sia acquistata nelle rivendite.

Ogni campione di carne appena raccolto veniva chiuso in un barattolo di vetro perfettamente pulito e secco e portato in laboratorio. Quivi subito se ne prelevavano piccoli pezzetti che si tagliuzzavano con le forbici e si ponevano in pesafiltro a bocca larga e ben pulita, da cui poi si prendevano due parti pesate per differenza colla bilancia di precisione.

Una serviva per la determinazione dell'azoto, l'altra per quella dell'ammoniaca; una terza parte per la determinazione dell'umidità.

Il resto della carne veniva lasciato nella temperatura dell'ambiente, senz'altra precauzione che quella di sospenderla e di coprirla con una reticella metallica; dallo stesso poi si prelevavano in seguito altre quantità che si trattavano identicamente alle precedenti.

I valori ottenuti riferiti a 100 parti di carne, mi fornirono il modo di farmi un concetto del diportamento dell'ammoniaca e dell'azoto totale nelle carni frolle e putrefatte nonchè del valore da dare ai rapporti $\frac{\text{azoto totale}}{\text{ammoniaca}}$; $\frac{\text{azoto totale}}{\text{perdita di peso}}$; $\frac{\text{ammoniaca}}{\text{perdita di peso}}$ nel periodo di frollatura e in quella di putrefazione.

1. — *Determinazione della perdita di peso.*

La perdita di peso, venne determinata ponendo la carne in pesafiltri larghi ben asciutti (che venivano posti in essiccatori ad $H^2 SO^4$ favorendo l'essiccamento col vuoto per mezzo di una pompa ad acqua) sino a peso costante. Venne preferito questo procedimento all'altro dell'essiccamento mediante il calore in una stufa a 100°, perchè da alcune esperienze di controllo fatte, si potè vedere che con questo secondo procedimento, la carne putrefatta continua spesso a fornire una umidità °/₀ pressochè identica a quella che fornisce la carne frolla (intorno a 70-74 come ha veduto anche il Tusini), mentre, con quello adottato, la perdita diminuisce di molto nella carne man mano che trascorre tempo dalla macellazione o dalla compera, e i dati che si ottengono, sono più adatti a servire di criterio per giudicare dello stadio di frollatura, specialmente poi dovendosi stabilire dei rapporti indici.

2. — *Determinazione dell'ammoniaca e dell'azoto totale.*

Per seguire una tecnica rigorosamente esatta e controllabile ho anzitutto presi in considerazione i metodi per la determinazione dell'ammoniaca e dell'azoto totale.

Scelta dei procedimenti per dosare l'azoto totale. — I varii processi conosciuti si raggruppano in due classi: processi nei quali l'azoto si determina in forma gassosa, e processi nei quali l'azoto si determina deducendolo dall'ammoniaca.

Per la determinazione dell'azoto in volume, la sostanza organica azotata viene bruciata per mezzo dell'ossido ramico, coll'aiuto del calore. Si formano dell'acqua, dell'anidride carbonica, dell'azoto e dell'ossido d'azoto. Questo ultimo viene trasformato in azoto da una spirale di rame metallica, rovente, cosicchè si ha solo azoto, anidride carbonica e acqua. Questa si condensa nelle parti fredde dell'apparecchio e l'anidride carbonica con l'azoto mescolati, si possono raccogliere insieme, oppure, facendo assorbire l'anidride carbonica dalla potassa caustica, si ha azoto puro soltanto. Nel primo caso si determina solamente il rapporto fra l'anidride carbonica e l'azoto e se ne deduce la quantità come nei metodi di Liebig, di Bunsen, di Marchand con le modificazioni di altri autori.

Nel secondo caso si ottiene solo azoto e dal volume se ne calcola il peso, tenendo conto della temperatura e della pressione. Così si opera secondo i metodi di Dumas con le relative modifiche. È questo il metodo preferito dai chimici per la sua esattezza; ma essendo delicatissimo non è esente da difficoltà e non è possibile che per i chimici.

Ho preferito quindi di dosare l'azoto totale sotto forma di ammoniaca.

Sin oggi non si conoscono che due metodi, quello di Varrentrapp-Will, e quello di Kjeldahl con le loro numerose modificazioni.

Il metodo di Varrentrapp e Will è basato sul principio che, se si scalda al rosso una sostanza organica azotata, con un alcali idrato, si ha anidride carbonica che si combina coll'alcali, dando carbonato e dell'idrogeno na-

scente che si combina all'azoto formando ammoniaca. Questa ammoniaca che si svolge viene fissata da una soluzione d'acido cloridrico e determinata, per via ponderale facendone il cloroplatinato e determinata per via volumetrica o fissata da una soluzione titolata di acidificazione di acido.

Per le mie ricerche ho preferito il metodo Kjeldahl come il più adatto al caso mio, metodo che, come si sa, riposa sull'azione dell'acido solforico, concentrato, scaldato vicino al suo punto d'ebollizione, sopra le sostanze organiche azotate e sulla trasformazione dell'azoto in ammoniaca, che poi si combina all'eccesso d'acido solforico, formando solfato ammonico. Per determinare l'azoto basta quindi determinare l'ammoniaca perchè questa proviene dall'azoto che in altra forma si trovava nella sostanza organica: solo in alcuni casi, quando si formano dei composti azotati resistenti, si completa l'ossidazione col permanganato potassico, o si favorisce con ossidi metallici.

Generalmente, per applicare il metodo di Kjeldahl si opera così: in un pallone di vetro di Boemia si mette una quantità esattamente pesata della sostanza in esame, che oscilla tra mezzo grammo ad 1, si aggiungono 25 grammi di acido solforico concentrato e puro e 0. 6 di mercurio.

Si scalda lentamente sopra una reticella metallica o in bagno di sabbia senza far bollire, fino a che il liquido sia divenuto pochissimo o punto colorato. Si fa freddare ed in questo liquido si determina l'ammoniaca nel modo seguente.

Si diluisce il residuo della distruzione con abbondante quantità di acqua esente d'ammoniaca, si rende la soluzione alcalina con liscivia concentrata di soda o di potassa caustica; si aggiungono varie goccie di soluzione concentrata di solfuro di potassio per trasformare in solfuro il mercurio ed alcuni pezzetti di pomice per regolare l'ebollizione.

Io per però la neutralizzazione e per la distillazione ho data la preferenza al seguente dispositivo (fig. II).

Ci si serve di un pallone del Kieldahl in cui viene trasformato l'azoto in ammoniaca della capacità di 400 cmc. circa: si chiude questo pallone con un turacciolo di sughero a due fori; per uno passa un tubo a sviluppo con una o più bolle entro cui, il prolungamento della parete superiore del tubo s'arrovescia, così si è sicuri che nessuno dei possibili schizzi della liscivia alcalina passi; per l'altro foro del turacciolo passa il tubo di un imbuto a rubinetto.

Il tubo di sviluppo a bolle, comunica con un refrigerante comune di vetro, la cui estremità inferiore è curvata in giù e penetra attraverso un turacciolo a chiusura ermetica, entro una bevuta. Infine un tubo ad U sta in comunicazione con la bevuta per mezzo d'un tubicino che attraversa il turacciolo della bevuta e quello di una branca del tubo ad U.

I tubi di sughero sono imbevuti a caldo con un grasso insaponificabile.

Montato così l'apparecchio, si comincia a mettere l'acido cloridrico $N/_{10}$ addizionato di alcune goccie di tintura di tornasole (che è sempre da preferirsi), tanto nella bevuta che nel tubo ad U e si rimette tutto a posto, avendo cura che i turaccioli chiudano in modo perfetto. Nel tubo ad U bastano 3 a 7 cmc. della soluzione d'acido titolata. Si diluisce con acqua il prodotto della distruzione, si chiude e si congiunge col refrigerante.

Si lasciano quindi cadere poco per volta 100 cmc. della soluzione di soda o di potassa al 25 °/₀ mediante l'imbuto a rubinetto, poi 30 cmc. della soluzione di solfuro sodico e potassico al 10·13 °/₀ e finalmente altri 50 cmc. della soluzione alcalina. Si chiude il rubinetto dell'imbuto e si porta il liquido dolcemente all'ebollizione. Si distillano i due terzi di liquido circa, si smonta l'apparecchio, si versa il contenuto del tubo ad U, con le acque di lavaggio nella bevuta con potassa $N/_{10}$ e si titola a caldo.



Fig. II.

Dal numero di cmc. che costituiscono la differenza fra il numero di cmc. di acido messi nel matraccio e nel tubo ad U e quelli di potassa impiegati per neutralizzare, nella operazione poco fa accennata, si calcola l'ammoniaca ed in seguito l'azoto.

Scelta dei procedimenti per dosare l'ammoniaca. — Per determinare poi l'ammoniaca dei sali ammoniacali e l'ammoniaca che si forma dai gruppi ammidici labilmente legati alla molecola albuminoide ho dovuto usare una base debole, perchè tanto la potassa quanto la soda e la calce caustica decompongono all'ebollizione fortemente le sostanze albuminoidi e gran parte del loro azoto lo trasformano in ammoniaca.

A questo scopo risponde pienamente l'ossido di magnesio.

L'apparecchio che ho usato è quello sopra descritto. In questo caso si può fare a meno dell'imbuto a rubinetto (fig. III). Ho adoperata magnesia

di fresco calcinata in quantità di 5 a 10 gr. per ogni determinazione, in circa 400 cmc. di liquido, facendo uso di un pallone della capacità di circa 800 cmc.



Fig. III.

Per evitare la schiuma, che facilmente si formava, ho dapprima posto dentro al pallone dei tubicini esili e capillari di vetro e scaldato il pallone di fianco; ma poi, ho preferito di coprire la pancia del pallone con una rete metallica, scaldando adeguatamente a fiamma diretta sul fianco: con questo mezzo sono riuscito costantemente ad evitarla.

B — Risultati ottenuti.

Ciò premesso, ecco i dati (riferiti alla carne secca) delle determinazioni fatte sulle carni frolle e putrefatte: nonchè su carni che si sospettava trovarsi in un periodo intermedio, specialmente per il modo di presentarsi delle fibre muscolari all'esame microscopico (per la elasticità, frammentabilità, omogeneità degli strati) e all'esame batteriologico (per la presenza di molti batteri anche nella massa della carne):

STATO DELLA CARNE	Regione da cui fu prelevata	Tempo trascorso dalla macellazione o dalla compera	Umidità %	Ammoniaca % in peso	Azoto totale % in peso
In base ai dati microscopici si giudica frolla; *la reazione è anfotera.*	Costa, glutei e scapola	Macellata da varie ore	74.9	0.16	3.87
	Filetto . . .	Appena comperata	74.5	0.16	3.01
	Spalla . . .	»	74.4	0.09	3.48
	Coscia . . .	»	77.6	0.13	3.25
Quantunque organoletticamente, manchi qualunque segno di putrefazione, per i dati microscopici si giudica esser trascorso il periodo di frollattura; *la reazione è leggermente alcalina* (?).	Costa	»	72.8	0.44	4.01
	Costa, glutei e scapola	Macellata da poco più di un giorno	74.1	0.21	4.68
In base ai dati organolettici si giudica putrefatta; *la reazione è alcalina.* *	Filetto . . .	Dopo 3 giorni dalla compera	19.0	0.54	10.17
	Spalla . . .	Dopo 4 giorni dalla compera	17.4	0.40	11.26
	Coscia . . .	Dopo 6 giorni dalla compera	16 3	0.68	11.51
	Costa	Dopo 3 giorni dalla compera	25.6	0.47	9.28

* *NB.* La carne putrefatta è tenuta, durante il tempo decorso dalla compera, sospesa sotto una reticella in ambiente non umido, alla temperatura di 28°-30° C.

Dalla tabella precedente si rileva:

1° che la quantità di ammoniaca che si ricava dalle carni che si giudicano, per i caratteri organolettici e microscopici, *frolle*, è inferiore a quella che si ricava dalle *carni in putrefazione:* è però im-

possibile stabilire un limite netto tra il periodo della frollatura e quello della putrefazione, perchè da carni sospette di non essere più frolle, ma certamente non putrefatte, si può ricavare la stessa quantità di NH_3 che si ottiene da quelle putrefatte;

2° che la quantità di azoto totale che si ricava dalle carni giudicate frolle, appare di molto inferiore a quella che si ricava dalle putrefatte: però non è possibile dedurre un limite netto tra il periodo della frollatura e quello della putrefazione, perchè dalle carni che passano dal periodo di frollatura a quello della putrefazione se ne ricavano quantità molto vicine a quelle delle carni frolle e quindi le differenze rispetto al periodo della frollatura sono troppo piccole e lasciano adito a dubbi.

Dai dati relativi all'ammoniaca, all'azoto totale e all'umidità, stabilendo ora i due rapporti fondamentali:

$\frac{\text{Azoto totale}}{\text{ammoniaca}}$ del Mai e $\frac{\text{ammoniaca}}{\text{perdita di peso}}$ mio, ossia due rapporti l'uno tecnicamente lungo e poco pratico, l'altro facile e alla mano, si hanno i risultati che passo ad esporre.

Il rapporto $\frac{\text{azoto totale}}{\text{ammoniaca}}$ del Mai, siccome non è detto dall'autore, se per ottenerlo si debba ricorrere a cifre che indichino l'azoto totale e l'ammoniaca in cmc. di NH_3 $N/_{10}$ o in peso, oppure se si debbano tali cifre riferire alla carne secca, o a quella umida (nel caso della carne putrefatta) primitiva, così, si possono stabilire rapporti con cifre diverse ed ottenere i dati esposti nella seguente tabella:

STATO DELLA CARNE	Regione da cui fu prelevata	Tempo trascorso dalla macellazione o dalla compera	Rapporto $\frac{\text{Azoto totale}}{\text{Ammoniaca}}$ (Mai)			
			Volumetrico		Ponderale	
			riferito alla carne come fu acquistata	riferito alla carne umida primitiva	riferito alla carne come fu acquistata	riferito alla carne umida primitiva
Frolla. . . .	Costa, glutei e scapola	Macellata da varie ore	28 83	..	24.18	..
	Filetto . . .	Appena comperata	22.17	..	18.81	..
	Spalla . . .	»	46.50	..	38.66	..
	Coscia . . .	»	28 78	..	25.0	..
	Costa	»	10.88	..	9.11	..
? ? ?	Costa, glutei e scapola	Macellata da poco più di un giorno	26.08	..	22.2	..
Putrefatta . .	Filetto . . .	Dopo 3 giorni dalla compera	22.59	2.25	18.83	1.86
	Spalla . . .	Dopo 4 giorni dalla compera	33.86	3.38	28.15	2.78
	Coscia . . .	Dopo 6 giorni dalla compera	20.46	2.04	16.91	1.68
	Costa	Dopo 3 giorni dalla compera	23.71	2.37	19.72	1.93

Dove si vede che i valori dei rapporti riferiti alle carni frolle e quelli riferiti alle carni putrefatte si aggirano, tenendo conto dei dati volumetrici e ponderali, intorno a cifre simili: solo, nel fare i rapporti ci si serva dei valori che si ottengono riportando la carne putrefatta alla carne umida primitiva, si hanno delle cifre più piccole riferite alle carni putrefatte. Non si può però stabilire con

questo mezzo un limite netto tra il periodo di frollatura e quello di putrefazione.

Il rapporto $\frac{\text{ammoniaca}}{\text{perdita di peso}}$ comunque si faccia, è rappresentato da cifre molto più basse nelle carni frolle che nelle putrefatte: nelle carni che si giudicano trovarsi tra il periodo di frollatura e quello di putrefazione, è rappresentato da cifre intermedie. Ciò risulta dalla seguente tabella:

STATO DELLA CARNE	Regione da cui fu prelevata	Tempo trascorso dalla macellazione o dalla compera	RAPPORTO Ammoniaca / perdita di peso — Volumetrico — riferito alla carne come fu acquistata	Volumetrico — riferito alla carne primitiva	Ponderale — riferito alla carne come fu acquistata	Ponderale — riferito alla carne primitiva
Frolla	Costa, glutei e scapola	Macellata da 3 ore	1. 3	..	0. 0021	..
	Filetto . . .	Appena comperata	1, 3	..	0. 0022	..
	Spalla . . .	»	0. 7	..	0. 0012	..
	Coscia . . .	»	1. 04	..	0. 0017	..
???	Costa . . .	»	3. 6	..	0. 0061	..
	Costa, glutei e scapola	Dopo poco più di un giorno dalla compera	1. 7	..	0. 0029	..
Putrefatta . . .	Filetto . . .	Dopo 3 giorni dalla compera	16. 9	10. 8	0. 0287	0. 0185
	Spalla . . .	Dopo 4 giorni dalla compera	13. 2	8. 4	0. 0232	0. 0148
	Coscia . . .	Dopo 6 giorni dalla compera	24. 6	15. 2	0. 0419	0. 0259
	Costa . . .	Dopo 3 giorni dalla compera	10. 8	7. 4	0. 0185	0. 0127

Da dove si dovrebbe dedurre che finchè la carne presenta un rapporto volumetrico espresso da cifra non superiore ad 1. 5 e quello ponderale non superiore al 0. 0025 è *frolla*. Quando invece i relativi rapporti sono rappresentati da cifre superiori a 8 (rapporto volume-

trico riferito alla carne primitiva) ed a 0.01 (rapporto ponderale riferito alla carne primitiva), la carne è *putrefatta*. I rapporti intermedi tra i primi e i secondi indicherebbero che la carne *sta nel periodo intermedio tra la frollatura e la putrefazione*.

Conclusione.

1. La frollatura delle carni è indipendente dalla presenza di qualsiasi germe, poichè mediante esperimenti rigorosi si può ottenere in assenza di essi.

2. Nella carne col trascorrere tempo dall'avvenuta macellazione aumenta la quantità di NH_3 che si può ricavare; aumento che diviene accentuatissimo, nel periodo di putrefazione, ma che non segna un limite netto tra un periodo e l'altro.

3. Il rapporto del Mai $\frac{\text{azoto totale}}{\text{ammoniaca}}$ non può servire ad indicare quando una carne cessa d'essere frolla: nel caso mio si sarebbe prestato invece meglio il rapporto $\frac{\text{ammoniaca}}{\text{perdita di peso}}$ molto più rapido e alla mano; si comprende però che derivando da due dati non fissi (ammoniaca, perdita di peso), rimane da vedere, applicandolo su larga scala, se ad esso possa attribuirsi una importanza decisiva in tutti i casi, per stabilire il momento in cui una carne da frolla comincia a passare nel periodo putrefattivo.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

Il funzionamento del sistema di ventilazione, riscaldamento e refrigeramento dell'*Aula del Parlamento Italiano* studiato dal punto di vista igienico

per il prof. O. CASAGRANDI.

La Camera nella tornata dell'11 luglio 1897, su proposta degli onorevoli Pantano, Lucchini, Garavetti, Lovito, Fazi, Gallini, Bosdari e Morandi, convinta che ragioni imperiose d'igiene, di sicurezza e di buon andamento dei lavori parlamentari, rendevano urgente di provvedere alla costruzione di una nuova Aula parlamentare, incaricava la Presidenza di bandire un concorso per la costruzione dell'Aula suddetta.

In adempimento di tale deliberazione, la Presidenza procedeva immediatamente alla nomina di una Commissione parlamentare composta degli onorevoli Martini, F. Biscaretti, Celli, Colombo, Luzzatto A., Pantano, Panzacchi, Rizzo e Sacconi, commettendole l'incarico di compilare il programma di concorso per la costruzione di una nuova aula.

E la detta Commissione presentava il 21 luglio 1897 la sua relazione proponendo di bandire un concorso sopra un programma che constava di 7 articoli di cui il 4° contemplava l'impianto di un sistema di riscaldamento, refrigeramento e ventilazione dell'Aula e dei locali adiacenti.

L'articolo dice: *Il riscaldamento dovrà essere centrale, misto a vapore ed aria calda e procurare una temperatura interna massima di*

20° C. data la temperatura esterna di 0°. Il refrigeramento dovrà dare una temperatura interna di 18° a 24° C. data la temperatura esterna di 28° a 34° C. La ventilazione dell'aula dovrà dare tante volte 40 metri cubi d'aria ogni ora, quante siano le persone che possono contenere l'aula e le tribune. La ventilazione dovrà rinnovare l'aria almeno due volte l'ora e potersi ottenere sia dall'alto al basso, sia dal basso all'alto.

I progetti presentati furono 27 e la Commissione (presidente-relatore on. Colombo, segretario on. Biscaretti; Celli e Panzacchi, architetto Luca Beltrami e professori Pisanti e Schioppa) venne alla conclusione, accettata dal Consiglio di Presidenza nella tornata del 3 luglio 1898, di bandire un nuovo concorso tra 4 progetti scelti fra i 27 presentati.

Tra i progetti intanto quello dei signori G. Koch, A. Marchesi e G. Mengarini, per esprimerci con le parole stesse della Commissione: « Dal punto di vista dello studio del riscaldamento e del raffreddamento dell'aria, della ventilazione e del risanamento del palazzo è assolutamente superiore agli altri. Per la ventilazione si provvede ad evitare, riducendo la velocità dell'aria a pochissimi centimetri al secondo, le correnti così nocive e moleste; l'inversione della ventilazione richiesta dal programma è ottenuta in modo semplice e ingegnoso.

« Il raffreddamento dell'aria nell'estate si fa col metodo più ovvio dell'acqua polverizzata, provvedendo poi a liberare l'aria dall'eccesso di umidità prodotta dall'abbassamento di temperatura; e giustamente gli autori si preoccupano anche del rinfrescamento della tettoia, ottenuto con un velo di acqua. Quanto al riscaldamento, esso è calcolato in tutti i particolari. . . . . Tutte le altre questioni relative ai motori, alle caldaie, e alle distribuzioni di energia elettrica, sono pure esaminate e risolute a fondo ».

⁂

Frattanto, date queste conclusioni, prima di procedere alla costruzione della nuova aula, si invitò il prof. Mengarini, autore della parte fisica del progetto stesso, cioè di quella riguardante il sistema di ventilazione, riscaldamento, refrigeramento adattabile all'Aula e locali adiacenti, di dare esecuzione all'impianto che poteva essere intanto applicato all'Aula provvisoriamente costruita nell'ala sinistra del palazzo Berniniano.

***

Alcuni mesi dopo, cioè nell'aprile 1901, dietro consiglio dell'onorevole Celli e a desiderio dell'ing. Mengarini intrapresi allora lo studio dal punto di vista igienico (1) del funzionamento dell'impianto dei sistemi di ventilazione, di riscaldamento e di refrigeramento dell'Aula di Montecitorio.

Prima però di parlare delle ricerche fatte e dei risultati ottenuti, credo necessario premettere una descrizione dell'impianto stesso, tenendo anche presente quale esso dovrebbe essere stato, se si fosse dato mano ad eseguirlo completamente conforme al progetto, ciò che ricavo dalla relazione del prof. Mengarini unita al progetto sopracitato.

I.

Descrizione dell'impianto e del suo funzionamento.

Bisogna anzitutto notare che nel nuovo impianto era compreso non solo il riscaldamento e la ventilazione dell'Aula, delle Tribune e della sala dei Passi perduti, ma anche quello di tutto l'edificio situato fra il cortile e l'estremità nord del palazzo. Per cui il progetto del Mengarini venne diviso in tre parti:

1. Riscaldamento, ventilazione, inumidimento e refrigeramento dell'aria per l'Aula e le Tribune;

2. Riscaldamento, ventilazione, inumidimento e refrigeramento

---

(1) Sento frattanto il dovere di ringraziare il chiarissimo sig. prof. Mengarini per la favorevole occasione fornitami di procedere a tale studio, per l'interesse spiegato alle mie ricerche e per le molte dilucidazioni datemi. Colgo anche l'occasione per ringraziare la spettabile Direzione della Questura della Camera in persona dell'on. Giordano-Apostoli per il permesso accordatomi, nonchè l'egregio comm. Caruso, direttore dei servizi amministrativi, che mise a mia disposizione quanto poteva occorrermi per disporre gli apparecchi.

Ringrazio anche il cav. Arnaud, ingegnere, incaricato dalla direzione del funzionamento dell'impianto stesso, il quale, di per sè, o per mezzo dell'ottimo macchinista sig. Manetti, si prestò tutte le volte che mi occorse di dover ricorrere alla loro cortesia. Finalmente ringrazio anche il dott. Bajardi, che mi coadiuvò nelle ricerche facilitandomi il compito non lieve di dovere procedere nello stesso tempo a ricerche identiche in luoghi diversi.

dell'aria pei locali ove la demolizione dei caloriferi e delle canne esistenti rendeva obbligatorio l'impianto del nuovo sistema;

3. Riscaldamento e ventilazione col nuovo sistema della parte del palazzo ove erano conservati gli attuali caloriferi colle relative prese e canne d'aria.

Ora, di queste tre parti del progetto fu data esecuzione per intero solo alla prima, e per la seconda solo in quanto si riferisce al riscaldamento.

1. *Presa d'aria pura.* — Per la presa dell'aria sana venne utilizzato il grande camino esistente nella parte sud del palazzo e prospicente sulla piazza di Montecitorio per la presa dell'aria fresca (di mq. 13 di sezione e dell'altezza di m. 52).

La quantità d'aria occorrente per ora in totale per l'Aula, Tribune e sala dei Passi perduti venne calcolata in mc. 66,129 per ora e per la parte del palazzo dove poteva conservarsi il vecchio sistema di ventilazione in mc. 31,350; il volume d'aria il quale doveva passare per il camino di presa dell'aria fresca doveva corrispondere in totale a mc. 97,440 all'ora e al secondo 97.440 : 3600 = 27.06 metri cubi: avendo poi il camino la sezione di m. 13 circa la velocità dell'aria nel camino doveva corrispondere a 27.06 : 13.00 = 2.08 al secondo.

2. *Asportazione dell'aria viziata.* — L'aria viziata dall'Aula e dalle Tribune viene aspirata e diretta ad un camino di richiamo costrutto nel punto il più distante dal camino di presa dell'aria fresca, e cioè nell'estremo punto sud del palazzo di Montecitorio.

3. *Ventilatori di presa e di richiamo.* — Il volume d'aria del grande camino e quello del nuovo vennero regolati da ventilatori centrifughi direttamente accoppiati a motori elettrici a corrente alternante ad induzione, cioè senza collettori e spazzole, da comandarsi e mettere in moto a distanza secondo le indicazioni che l'impiegato addetto rileva da strumenti di controllo. E dai minuziosi calcoli fatti, risultando che per la presa dell'aria sana necessitavano due ventilatori di mc. 6532 all'ora azionati da due motori elettrici di 1.5 cavalli vapore l'uno e per l'estrazione dell'aria viziata dall'Aula e dalle Tribune, due ventilatori di cavalli 3.5 ciascuno, così vennero impiantati 4 ventilatori, due al camino di presa, due al camino di richiamo.

4. *Filtri.* — L'aria chiamata in basso nella grande canna del vecchio palazzo, incontra dei filtri e li attraversa.

Questi filtri sono posti nella porzione rettangolare del camino, che va dal piano terreno fino al sotterraneo. Si tratta di filtri così

detti a superficie e di un modello specialmente ideato allo scopo di nettare l'aria dalle materie più grossolane trascinate (1).

Al principio del canale si trovano poi altri filtri di tela a sacco in modo da facilitare la caduta del pulviscolo trattenuto dalla tela (2).

5. *Gallerie di percorrenza dell'aria.* — Attraversati i filtri, l'aria doveva percorrere una galleria parallela alla fronte del palazzo Berniniano e da questa immettersi in tre canali principali (3); il primo per alimentare il braccio sinistro od ovest dell'edificio, il secondo l'Aula e le Tribune, il terzo il braccio destro od est.

Essendosi eseguita solo la parte prima del progetto, l'aria sana diretta nel canale (che corrisponde a quello di mezzo del progetto) senz'altre comunicazioni con canali laterali perviene sotto l'aula in una stanza di calma, ove si distribuisce a raggera sotto tutti gli scanni, sotto le scale e nelle pareti ove non risiedono persone, attraverso griglie a larghe maglie. La grande superficie di queste griglie fa sì che l'aria anche nei momenti di massima ventilazione, cioè in piena estate, e con circa 1000 persone nell'aula, raggiunga appena cm. 2 di velocità al secondo.

Al principio del canale che porta l'aria fresca si trovano successivamente disposti gli apparecchi per il lavaggio dell'aria, quelli per il riscaldamento e l'inumidimento per l'inverno e quello per il raffreddamento nell'estate; l'apparecchio per il disidratamento calcolato in progetto con minuziosa analisi non fu ancora eseguito per ragioni di economia.

---

(1) Essi sono costituiti da tante bande di filtro alte 10 centimetri, spesse 3 millimetri, fissate a telai di ferro ad L disposti orizzontalmente.

Sull'orlo di questi telai sono ribattuti tanti pezzi di tondino, a guisa di piuoli, distanti cm. 8 l'uno dall'altro, sui quali si avvolgono i nastri di feltro, disposti a zig-zag, che così vengono a presentare la costa alla corrente d'aria. Questi telai sono disposti in 8 piani ed in numero di 18 per piano; si appoggiano sopra ferri ad L fissi, che formano battenti, per cui essi sono facilmente asportabili per spazzarne la polvere.

(2) Dai calcoli fatti sale a 20 il numero dei sacchi disponibili all'apertura del canale e a mc. 658 per ora e per metro quadrato la quantità dell'aria che deve passare.

(3) Questa distribuzione in canali renderà separatamente regolabili le principali parti del palazzo, che richiedono condizioni di regime affatto differenti e cioè:

1. L'aula e le tribune, esposte a nord, con grandi superficie vetrate ed in condizioni di orario e di servizio speciale.

2. Il braccio del fabbricato a destra, esposto a levante ed appena visitato dal sole.

3. Il braccio del fabbricato a sinistra, esposto a ponente e battuto dal sole nelle ore pomeridiane.

Solo il palazzo Berniniano, esposto al sud preciso, rimarrà con canali propri, regolabili separatamente.

6. *Caldaie*, *caloriferi*, *vasca di condensazione*, *apparecchi per il preriscaldamento.* — Il riscaldamento dell'aria è fatto secondo il sistema centrale a vapore ad alta pressione.

Le *caldaie* sono del tipo Babcock e Wilcox, si trovano al pianterreno del palazzo, al lato opposto di via della Missione, e mandano il fumo in una canna bassa molto distante dal camino di presa dell'aria, onde i prodotti di combustione non si mescolino con l'aria fresca.

I *caloriferi* per il riscaldamento dell'aula e locali annessi si trovano lungo il canale semicircolare, nonchè addossati a varie pareti del sotterraneo, dopo la camera di controllo e come in tutti questi impianti sono costituiti da batterie di tubi con nervature, nei quali circola il vapore a bassa pressione.

La *tubazione principale di vapore* dalle caldaie passa per la camera di controllo e giunge ad un distributore provvisto di 5 valvole, origine di 5 diramazioni principali, di cui due servono ai caloriferi dell'aula, due per il braccio di destra e per quello di sinistra, una per il palazzo Berniniano.

L'*acqua di condensazione*, proveniente dalle varie celle riscaldanti, raccolta in tubi, percorre gli stessi canali dell'aria fredda e questi tubi provvisti alla loro estremità di scaricatori automatici, mettono capo ad una vasca ove tutta l'acqua di condensazione del riscaldamento del palazzo, viene riunita. Un motorino elettrico ubbidendo alle indicazioni di un indice mosso da un galleggiante immerso nella vasca, fa funzionare una pompa rotativa sommersa, la quale solleva l'acqua calda fino ad un serbatoio posto in vicinanza delle caldaie, dal quale è di nuovo immessa in essa. Così salvo le perdite, è sempre la stessa acqua distillata che trasformata in vapore, si distribuisce ai caloriferi, e ridotta in acqua di condensazione viene di nuovo immessa nelle caldaie ad una temperatura di 60° circa.

All'aria pura si fa anzitutto subìre un preriscaldamento (di cui il Mengarini espone la necessità), per condurre gli ambienti nelle condizioni di temperatura ed umidità dell'aria atmosferica, come si ha nelle buone giornate primaverili.

Ciò egli previde si potesse ottenere col saturare l'aria ad una temperatura bassa di vapore d'acqua, in modo che col riscaldamento successivo e definitivo, essa venisse al grado di umidità voluto secondo i dettami igienici.

Partendo poi dal dato che l'umidità relativa in inverno a Roma è di 0.34, nella media dei giorni e delle ore in cui siede la Camera, e che un metro cubo d'aria a 0° contiene in queste condizioni 3.62 di vapore acqueo, stabilendo di portarlo a 12° col preriscaldamento, dopo opportuni calcoli riuscì a trovare (tenendo conto del volume d'aria che passa pel canale centrale) che bisognava aggiungere grammi 6.981 per metro cubo d'aria.

Egli dimostrò ancora con una minuziosa analisi, che è più conveniente preriscaldare tutta l'aria e saturarla a una certa temperatura in un primo ambiente e poi farla espandere in un successivo alla temperatura voluta per

l' immissione dell'aria, anzichè mescolare una parte del volume richiesto freddo compensando le differenze di saturazione.

7. *Apparecchio d'inversione.* — Subito il riscaldamento l'aria pura dal canale centrale doveva giungere al disotto dell'Aula passando attraverso un apparecchio d'inversione ingegnosissimo che avrebbe permesso di ottenere la ventilazione dal basso all'alto in estate e dall'alto in basso nelle giornate più fredde dell'inverno.

Quest' inversione ora si ottiene con quattro porte di ferro. La 1ª all'innesto della galleria semicircolare col canale che si immette sotto l'Aula; la 2ª al termine del canale semicircolare, prima che s'inizi il cunicolo dell'aria viziata; la 3ª alla metà del canale che si immette sotto l'aula; la 4ª alla fine del canale parallelo a questa e che corrisponde di fronte all' inizio del cunicolo dell'aria viziata.

Quando si immette l'aria dal basso, rimangono chiuse le porte che mettono in comunicazione la galleria di presa con quella di richiamo, quindi la porta 1ª e 3ª. Ciò si fa nella ventilazione estiva sempre e nella ventilazione invernale quanto basta, come è generalmente il caso, salvo giorni freddissimi e sedute notturne, di immettere l'aria calda che abbia subito il semplice periscaldamento.

Allora l'aria pura viene cacciata attraverso gli scanni dentro l'aula e richiamata attraverso le canne dei caloriferi dalla volta dell'aula stessa; in tal caso i caloriferi fanno da bocche di richiamo.

Quando si immette l'aria dall'alto, ciò che si fa solo, ed eccezionalmente, nella stagione invernale, e occorre mettere in funzione anche i caloriferi per il riscaldamento definitivo, si apre la porta 1ª di comunicazione tra il canale di presa e quello di richiamo e si chiudono la 3ª, quella del canale che si immette sotto l'aula, e la 2ª quella che mette in comunicazione il canale semicircolare col cunicolo dell'aria viziata: l'aria pura si immette allora nei caloriferi, passa nell'aula, ne viene aspirata dalla platea, passa nella camera di calma sottostante e poi nel cunicolo attraverso l'apertura del canale parallelo a quello che si immette sotto l'aula, aprendo naturalmente la porta 4ª.

8. *Apparecchio per il refrigeramento.* — Il Mengarini partì dal concetto che la quantità di calore che devesi sottrarre ad un volume d'aria da raffreddare, corrisponde ai tre lavori seguenti: 1) raffreddamento dell'aria stessa; 2) raffreddamento del vapore d'acqua contenuto nell'aria sotto forma di umidità; 3) liquefazione di questo vapore di acqua se il raffreddamenlo è portato sino al punto in cui l'umidità relativa è del 100 per 100, ossia lo stato igrometrico dell'aria raggiunge la saturazione. Ai quali tre lavori, se ne doveva

aggiungere un quarto, quello cioè necessario a ridurre lo stato igrometrico dell'aria raffreddata, che in ogni caso è più elevato di quello dell'aria atmosferica, al grado igrometrico voluto dall'igiene.

Ora, egli, dopo una disamina della questione, potè convincersi che qualunque fosse il metodo, il processo, il congegno da adoperare per il raffreddamento, era un fatto fisico immutabile, che l'aria esterna al grado igrometrico di 0.60 a 0.30, come è in estate nelle ore meridiane dopo qualche grado di abbassamento della temperatura, sarebbe diventata satura di umidità. Quindi, dice il Mengarini, per renderla salubre ed aggradevole alla respirazione, bisogna sia almeno a 0.80 di umidità, cioè bisogna togliere di acqua gr. 3.66 a gr. 18.3 che l'aria contiene per mc., il che importa una quantità di calore da sottrarre in totale corrispondente a calorie negative 5562 per mc. d'aria.

E di questo numero di calorie, la metà circa è richiesta dall'acqua che che si deve condensare per ridurre lo stato igrometrico dell'aria a 0.80, mentre l'altra metà è richiesta per raffreddare l'aria (a seconda dello stato igrometrico che essa ha nei mesi estivi) dalla temperatura esterna fino al punto di saturazione.

Nè è possibile di prescindere da questo disidratamento dell'aria, giacchè chi non lo facesse, si esporrebbe ad introdurre nell'aula l'aria satura di umidità, sicchè il beneficio del refrigeramento dell'aria, si convertirebbe in un irrimediabile danno igienico.

Perciò il Mengarini, dopo aver bene studiati tutti i metodi noti e convenienti per raffreddare l'aria con la minima spesa, cioè con l'aria presa da sotterranei, col ghiaccio, con macchine frigorifere, mediante espansione, ne dedusse che « qualsiasi metodo fosse prescelto, le difficoltà che si riscontrano per il solo impiego dei mezzi meccanici, per refrigeramento, erano molte e importavano sensibile spesa, sia nell'impianto, sia nell'esercizio, sia in ambedue ».

Ricorse perciò al raffreddamento mediante il polverizzamento dell'acqua, la possibilità della cui pratica attuazione dedusse da una serie di esperienze dirette, fatte nella grande sala dell'officina elettrica dei Cerchi. E così stabilì che operando su 85,000 mc. d'aria, con un consumo di acqua di circa 2 litri per secondo, si poteva raffreddare di 10° il volume d'aria richiesto per l'intiero palazzo di Montecitorio, e che l'acqua Marcia, la quale in piazza di Montecitorio ha una pressione di 35 metri, poteva prestarsi a dare, senza necessità di pompe, o di meccanismi complicati, il voluto polverizzamento.

Quindi nel grande canale adduttore dell'aria fresca, dopo i filtri e i lavatoi, evvi una stanza destinata al refrigeramento, lunga metri 4, seguita da una stanza di calma lunga metri 11.

Nella prima sono dei *polverizzatori* alimentati dall'acqua Marcia, sotto pressione, che producono una nebbia finissima la quale turbina in vortici tutt'assieme con l'aria formando un intimo contatto. Questi polverizzatori sono del tipo di quelli che si usano per la peronospora della vite.

Nella seconda, è un organo indispensabile per questo genere di

raffreddamento dell'aria, composto di tante *tele verticali* verniciate con vernice speciale, le quali non sono attaccate menomamente dall'acqua, non comunicano sapore alcuno all'aria, rendono intimo il miscuglio dell'aria con l'acqua, trattengono le particelle d'acqua meccanicamente trasportate e permettono di avere un abbassamento notevole ed uniforme di temperatura.

Naturalmente raffreddando l'aria con questo mezzo bisognava pensare a disidratarla; ma l'impianto attuale non è fornito di alcun apparecchio per disidratare l'aria raffreddata, sebbene ciò fosse minutamente studiato nel progetto.

Il sistema proposto consisteva in serpentini ove circolava acqua raffreddata presa da cassoni ove veniva mantenuta al voluto grado mediante l'espansione dell'acido carbonico.

9. *Termografi, camera di controllo.* — Infine tutti gli ambienti ove si compie una funzione importante fisica e l'aula stessa, sono collegati mediante i termografi elettrici ingegnosissimi del Mengarini, che danno la temperatura e l'umidità in una camera di controllo ove risiede il sorvegliante. Questi ha nella stessa camera gli interruttori elettrici per la messa in marcia dei ventilatori e le valvole per la chiusura o lo strozzamento del vapore che accede alle batterie del preriscaldamento e del riscaldamento definitivo. Così un solo uomo può regolare da questa stanza la immissione, l'estrazione, il riscaldamento, l'inumidimento dell'aria al grado voluto e secondo il numero delle persone presenti nell'Aula, nonchè secondo il grado igrometrico e termico esterno.

10. *Eliminazione del calore irradiato*: — Debbo notare ancora che oltre al sistema di raffreddamento interno, è stato previsto uno sgocciolamento continuo d'acqua fredda sulle superficie esterna dei vetri del lucernario dell'Aula e ciò non per raffreddare l'aria dell'Aula che lo può essere mediante il previsto impianto refrigerante, ma per impedire il senso sgradevole dell'irradiazione dei vetri, riscaldati dal cocente sole estivo, sulle teste dei presenti.

***

Ciò premesso, dirò che l'impianto progettato, e che dovrebbesi eseguire per un'aula definitiva, presenta qualche variante su quanto ho descritto, che è meglio venga segnalato.

Quindi ecco riassunto in poche parole il sistema progettato per il riscaldamento, la ventilazione e il refrigeramento dell'aula, delle

tribune e dell'intero palazzo e quello adottato attualmente per l'**Aula**, ognuno corredato delle relative tavole di per sè stesse molto esplicative, favoritemi dal prof. Mengarini:

IMPIANTO PROGETTATO (Fig. I).

« Partendo dal camino di presa *O*, si giunge ai filtri *P* e ai ventilatori *V* e da questi ai tre canali per l'aula e le tribune, per il braccio Est e per il braccio Ovest. In ciascuno si trovano gli apparecchi per il lavaggio dell'aria *L*, per il preriscaldamento dell'aria a 12° *M*, le vasche per saturare l'aria a 12° *N*, le reti metalliche per il completo raffreddamento dell'aria in estate *R*, i serpentini *K*, con circolazione d'acqua salata a + 1° per togliere all'aria raffreddata in estate l'umidità eccessiva che viene ad avere qualunque sia il sistema impiegato per il raffreddamento. I caloriferi a vapore racchiusi nelle rispettive celle sono visibili in *S*. Sotto l'aula sono visibili le vasche d'inversione *A*, *B*, *A'*, *B'* (che fanno parte dell'apparecchio d'inversione ideato dal Mengarini) con la connessione al tappeto filtrante (che secondo il progetto dovrebbe esser posto sulla platea dell'aula) ma che non fu eseguito. Da queste vasche l'aria viziata è cacciata mediante il ventilatore *W* sotto alle caldaie *Q* dove viene bruciata la materia organica ch'essa contiene e poi insieme ai prodotti della combustione è espulsa dal camino di evacuazione *Z* ».

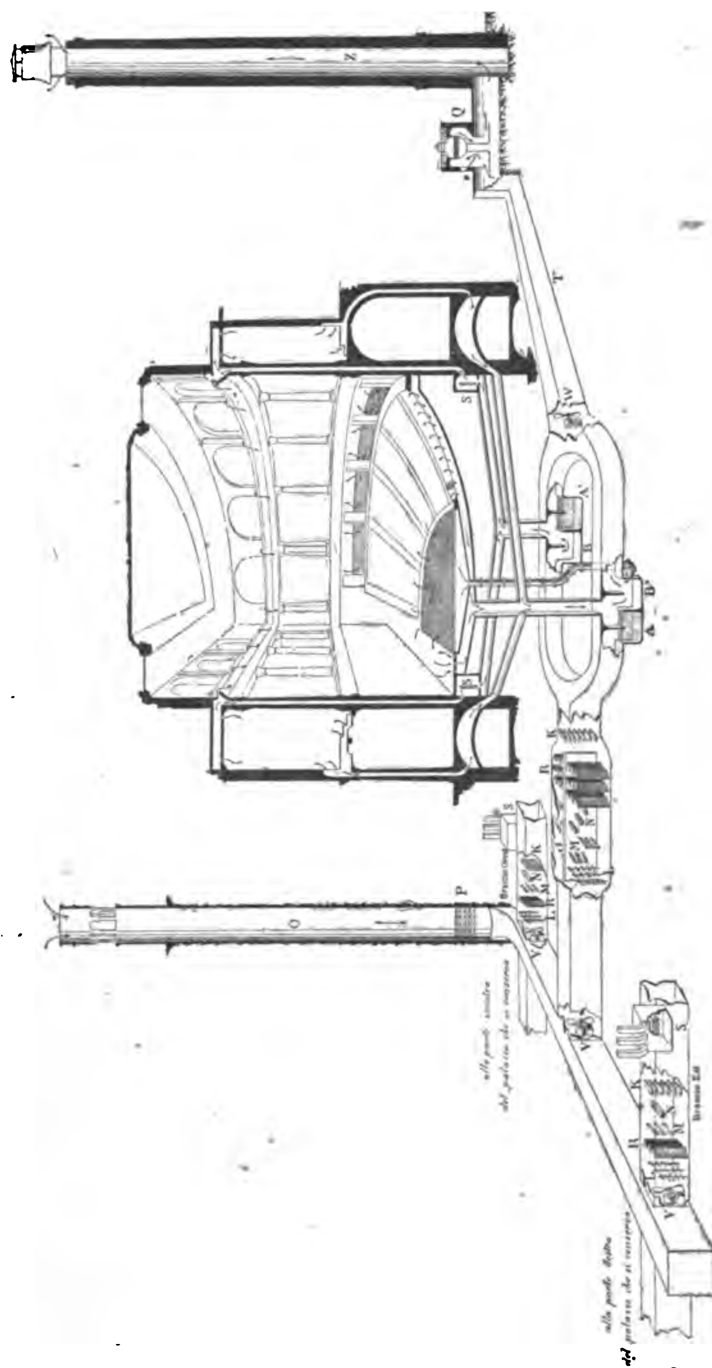


Figura I.

IMPIANTO ESEGUITO (Fig. II).

Partendo dalla base del camino di presa d'aria dove si trovano i ventilatori, si entra nel canale, dove si trovano gli apparecchi per il lavaggio, i filtri, le batterie per il preriscaldamento dell'aria in *K* e K^1 e si passa attraverso la porta 3 nella camera di calma Sp. sotto l'aula: questa si continua a destra in un canale parallelo al precedente e che termina colla porta 4. Alla metà del canale di presa si trova la porta 1 per la quale si entra nella galleria semicircolare. Lungo la parete sinistra di questa si trovano i caloriferi *Ca.* (Da questo canale per la scaletta *N* si accede nei sotterranei alla camera di controllo, ecc. e portandosi sul fronte del palazzo Berniniano alla scaletta *O* che fa accedere alla porticina *P* la quale mette in comunicazione il sotterraneo con la base del camino di presa d'aria).

All'altro estremo del canale semicircolare si trova l'inizio del cunicolo dell'aria viziata *T* a cui si accede attraverso la porta 2 (come attraverso la 4 dallo spiazzo sotto l'aula). In fondo al cunicolo si trovano poi i due aspiratori di richiamo per mandare l'aria nel camino di evacuazione.

Nella pianta sono anche segnati i punti I e II dove vennero da me impiantati gli apparecchi per l'esame chimico e batteriologico dell'aria.

II.

Esame dell'aria nella galleria di presa e in quella di richiamo.

Presa cognizione esatta del funzionamento del sistema di ventilazione, riscaldamento e refrigeramento ora descritto, mi persuasi subito che a voler praticare dal punto di vista igienico, lo studio del medesimo, era necessario procedervi in due diversi periodi di tempo: l'invernale e l'estivo, essendo, come risulta dal fin qui detto, diverso il modo di funzionamento nell'uno e nell'altro. E poichè si iniziava il periodo estivo, incominciai da questo riserbando all'anno dopo quello del periodo invernale.

In ambedue i periodi studiai l'aria che viene immessa nell'aula (aria sana) e quella che ne viene aspirata (aria viziata) durante sedute molto e poco frequentate, cercando di fare un esame di essa fisico, chimico e batteriologico, dal quale si potessero trarre deduzioni concludenti riguardo al funzionamento dell'impianto della ven-

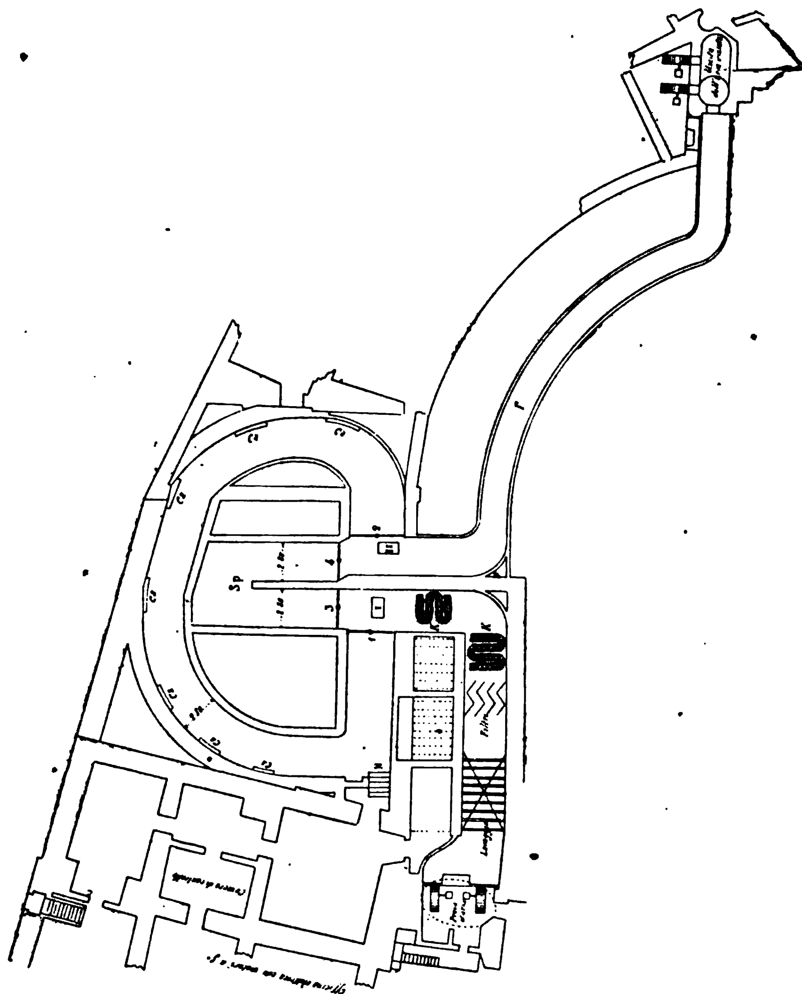


Figura II.

tilazione dell'aula, funzionando il sistema di riscaldamento o quello di refrigeramento.

Tengo però a far rilevare che nel periodo delle mie esperienze l'aria veniva immessa dal basso e richiamata dall'alto per cui non ho potuto fare uno studio del funzionamento dell'impianto quando esso funzioni inversamente.

Intanto, d'accordo col prof. Mengarini, stabilii due identiche stazioni di studio, l'una nella galleria di accesso dell'aria sana poco distante dalla platea dell'aula, l'altra all'inizio della galleria dell'aria viziata.

Quivi, sopra due tavoli, collocai due grandi casse a scompartimenti (fig. III), contenenti tutto il necessario per l'esame chimico e batteriologico dell'aria, da me appositamente ideate e fatte costruire anche per il caso che dovessero trasportarsi da un luogo ad un altro. Sul coperchio di tali casse, all'uopo si avvitavano delle aste metalliche per sostenere morse ed occhielli adatti a reggere gli apparecchi necessari per procedere all'esame chimico e batteriologico, cioè:

1) l'apparecchio di Petenkofer per l'acido carbonico (*A* a sinistra della figura);

2) l'apparecchio Casagrandi per l'esame batteriologico dell'aria (*C*);

3) dei bagni-maria con bocce a gorgogliamento per la ricerca delle sostanze organiche e dell'ossido di carbonio (*D*);

4) l'apparecchio a tamburello di carta bibula per la ricerca dell'idrogeno solfrato (*C*);

5) un tubo di Pettenkofer (*A* a destra della figura) per il gorgogliamento dell'aria in acqua distillata per la ricerca dell'ammoniaca, degli acidi nitroso, nitrico, cloridrico.

Sul piano feci anche in modo che rimanesse spazio sufficiente per porvi un ventilatore per misurare la velocità della corrente, un psicrometro per la misura dello stato igrometrico dell'aria.

Tutti gli apparecchi in cui era necessario far passare dell'aria vennero messi in comunicazione con degli aspiratori della capacità, quali di 20, quali di 25 litri. Soltanto per l'apparecchio dell'esame batteriologico si adoperò la pompa del Petri.

Cap. I.

Esame fisico.

Nell'esame fisico dell'aria si tenne in particolar modo conto della temperatura e dello stato igrometrico.

La prima si prelevava con appositi termometri controllati, della cui esattezza si era sicuri.

Il secondo mediante due ottimi psicrometri August, l'uno dell'Osservatorio del Collegio Romano che era già servito al professor Mengarini per altri studi, l'altro dell'Istituto d'igiene.

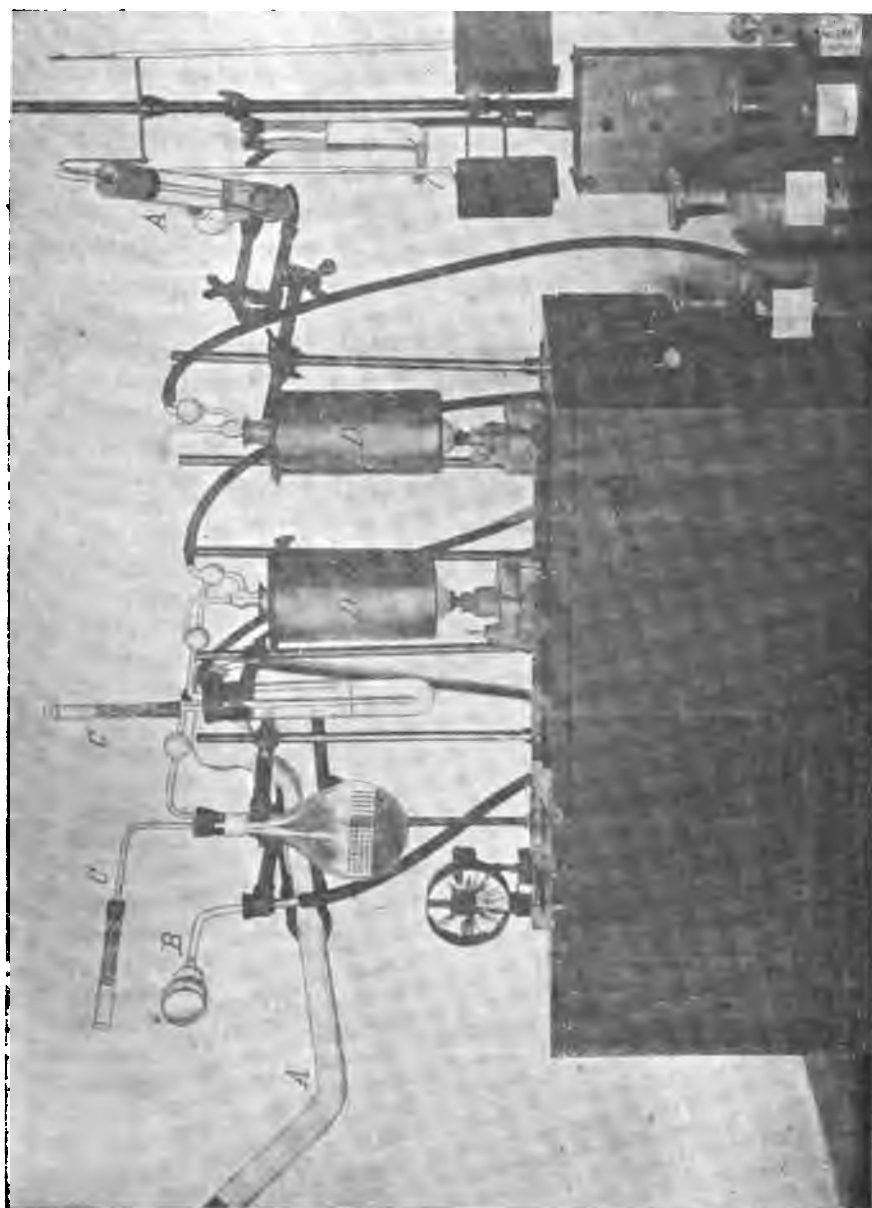


Figura 111.

A) *Temperatura dell'aria sana e viziata.*

Secondo il bando del concorso la temperatura cui si doveva portare l'aria dell'Aula, doveva essere tanto nella stagione invernale quanto nella stagione estiva intorno a quella delle migliori giornate primaverili ossia non superiore in inverno ai 20° C., tra 18°-24° in estate.

Ora io raccolsi i dati con la più grande esattezza alle ore 15 e alcune volte anche alle 14, alle 16 e alle 17, mettendoli in confronto con quelli dell'aria esterna presa alle ore 15.

Quando mi fu possibile tenni anche conto nel primo periodo d'osservazione della temperatura dell'Aula indicata dai termometri, termografi elettrici e nel secondo mi sono valso dei dati gentilmente fornitimi dall'ing. Arnaud il quale prese varie volte la temperatura di varie parti dell'aula (in corrispondenza del centro, della volta, del banco della presidenza, delle tribune).

Riassumo nei quadri seguenti i dati trovati..

Modo di diportarsi della temperatura durante il periodo estivo (24 maggio–28 giugno 1901).

DATA	Nella galleria dell'aria								Nell'aula	All'esterno - ore 15
	Sana				Viziata					
	ore 14	ore 15	ore 16	ore 17	ore 14	ore 15	ore 16	ore 17		
24 maggio 1901	..	19.0	..	..	..	19.9	..	..	..	22.0
25 »	..	16.9	..	..	..	17.0	..	..	..	18.6
26 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
27 »	..	18.4	..	..	..	19.0	..	..	..	22.9
28 »	..	20.0	..	..	..	21.9	..	..	..	22.4
29 »	..	20.8	..	..	..	21.0	..	..	..	24.0
30 »	..	21.0	..	..	..	22.0	..	..	..	27.1
31 »	..	21.5	..	..	..	23.0	..	..	..	26.1
1 giugno 1901	..	22.0	..	..	..	23.0	..	..	..	26.4
2 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
3 »	..	20.0	..	..	..	20.9	..	..	..	24.6
4 »	..	19.8	..	..	..	21.2	..	..	..	26.6
5 »	19.0	19.6	19.8	19.8	21.0	21.0	20.5	21.0	..	21.8
6 »	18.1	19.8	18.4	18.1	..	21.3	..	..	..	27.9
7 »	18.8	18.1	18.4	18.4	19.9	19.9	19.0	19.9	..	26.3
8 »	..	18.6	..	..	..	22.0	..	..	..	27.6
9 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
10 »	..	20.0	..	..	..	20.9	..	..	..	27.2

Segue *Modo di diportarsi della temperatura durante il periodo estivo (24 maggio–28 giugno 1901).*

DATA	Nella galleria dell'aria								Nell'aula	All'esterno - ore 15
	Sana				Visiata					
	ore 14	ore 15	ore 16	ore 17	ore 14	ore 15	ore 16	ore 17		
11 giugno 1901	..	20.2	..	..	..	21.0	..	..	..	24.8
12 »	..	22.0	..	..	..	23.0	..	..	..	27.3
13 »	..	21.3	..	..	..	23.2	..	..	..	26.4
14 »	19.4	20.1	19.2	18.4	19.7	22.6	21.0	22.0	..	27.2
15 »	20.2	20.3	20.6	20.3	20.4	22.5	22.0	22.2	..	26 4
16 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
17 »	20.0	20.4	20.3	20.6	20.4	20.3	21.0	21.3	..	23.7
18 »	16.5	18.4	19.0	19.4	22.6	18.4	18.0	18.4	..	21.8
19 »	16.9	16.9	18.0	17.0	19.4	16.3	19.4	19.5	..	20.4
20 »	19.0	19.1	19.1	19.1	19.5	20.0	20.0	20.0	..	20.4
21 »	19.0	18.5	18.5	18.7	20.5	20.9	20.9	20.9	..	22.3
22 »	..	21.0	..	..	..	20.2	..	..	..	27.8
23 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
24 »	19.0	19.3	18.7	19.3	21.7	22.1	21.5	22.6	..	27.1
25 »	18.0	18.3	18.3	18.3	21.7	21.9	21.5	21.8	..	27.0
26 »	17.7	18.7	18.0	18.0	22.5	22.3	22.8	22.9	..	26.7
27 »	17.7	18 3	17.0	18.0	22.5	22.1	22.5	22.0	..	28.5
28 »	18.5	18.4	19.1	18.4	22.0	22 3	22.0	22.1	..	29.4

Modo di diportarsi della temperatura durante il periodo invernale (10–17 marzo 1902).

Data	Nella galleria dell'aria								Nell'aula dalle 14 alle 17 ore, in corrispondenza						Nelle tribune dalle ore 14 alle ore 17		All'esterno ore 17
	sana				viziata				della volta		del centro		del banco della Presidenza				
	ore 14	ore 15	ore 16	ore 17	ore 14	ore 15	ore 16	ore 17	minima	massima	minima	massima	minima	massima	minima	massima	
10 marzo 1902	16.5	15.2	17.2	17.2	16.8	16.2	18.0	17.6	17.5	18.0	17.0	18.0	16 8	17.7	17.0	18.0	15.3
11 »	15.8	15.6	17.0	17.5	16.8	16.6	17.1	18.2	16.5	19.5	16.0	19.0	15.7	17.5	16.0	18.0	10.0
12 »	15.6	14.4	18.0	18.0	16.4	17.8	18.0	19.0	17.0	21.5	16.5	20.0	16.7	19.5	16.0	18 0	12.9
13 »	16.0	16.0	17.0	17 2	16 2	17.0	18.1	18.7	16.5	21.0	16.5	18.0	16.5	18.5	..	..	14.1
14 »	18.0	15.4	17.0	17.1	16.0	17.8	18.8	19.3	16.5	21.0	16.0	18.5	15.5	19.5	..	..	14.4
15 »	18.5	15.4	16.0	18.5	16.2	17 8	18.3	18.7	16.0	20 5	16.0	19.0	17.0	19.8	..	..	13.1
17 »	18.0	14.8	18 0	18.0	16.1	17.0	16.8	18.1	16.5	19.0	16.5	19.0	16.0	18.0	..	..	12.8

Coi dati precedenti si possono stabilire delle grafiche le quali rendono conto del modo di diportarsi della temperatura nei due periodi.

1° *Periodo estivo* (fig. IV). — In questo periodo la temperatura dell'aria sana ha seguito in massima le oscillazioni dell'aria viziata ed ambedue le curve della temperatura dell'aria sana e dell'aria viziata, hanno seguito quella dell'aria esterna con una differenza di gradi ora maggiore ora minore.

In genere la temperatura dell'aria sana ha variato da un minimo di 17° ad un massimo di 22° e quella dell'aria viziata pur aggirandosi intorno agli stessi gradi ha raggiunto un massimo di 23° ed eccezionalmente un minimo di 17°.

Però non v'ha dubbio che delle oscillazioni un po' strane se ne sono verificate le quali meritano di essere discusse.

Si sono infatti dati i seguenti casi:

1) La temperatura dell'aria sana eguaglia quella dell'aria viziata.

2) Quella dell'aria viziata diminuisce, mentre quella dell'aria sana tende a risalire.

3) La temperatura dell'aria sana si mantiene un po' superiore a quella dell'aria viziata.

Questi casi sottoposti ad uno studio accurato, a mio avviso, trovano spiegazioni nelle seguenti circostanze:

1) Se l'Aula rimane vuota per un tempo lungo o vi permangono poche persone la temperatura dell'aria viziata si eguaglia a quella dell'aria sana (tale il caso delle sedute del 25 e del 29 maggio in cui mancò il numero legale).

2) Se durante la seduta l'aula si spopola rapidamente, la temperatura dell'aria viziata rapidamente discende per equilibrarsi con quella dell'aria sana.

3) Se questo stesso caso si verifica durante giornate piovose la temperatura dell'aria viziata discende alquanto al disotto dell'aria sana, molto probabilmente per l'evaporazione degli abiti.

D'altro canto considerando le curve sia dell'aria sana che dell'aria viziata in rapporto alla curva dell'aria esterna appare evidente come, pur oscillando quest'ultima da un minimo di 18. 5 ad un massimo di 29. 5, è sempre possibile introdurre nell'aula aria raffreddata da mezzo grado ad oltre 10 gradi dal punto di introduzione.

Ora se ciò può far ritenere possibile di refrigerare l'aria in modo da immetterla nell'aula costantemente ad una data temperatura, op-

Curva della temperatura nel periodo estivo.

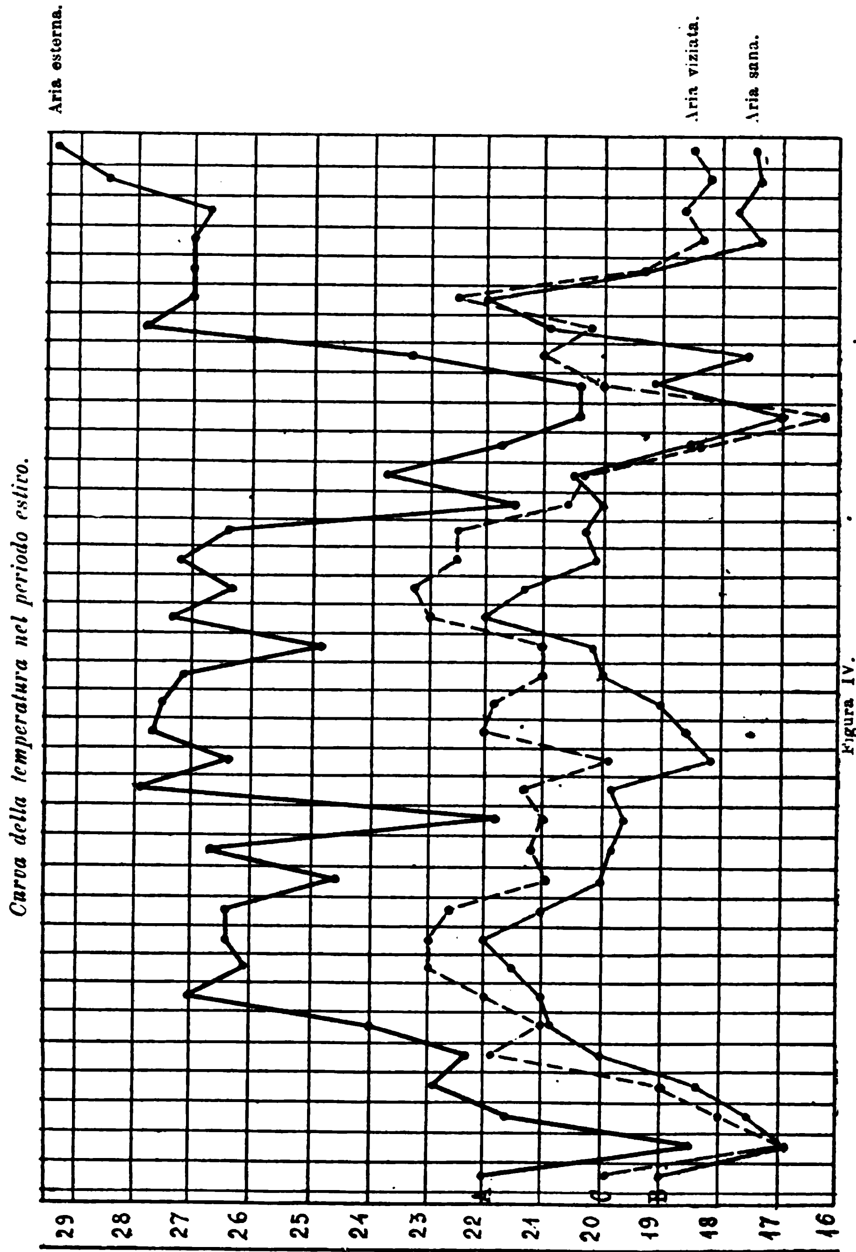


Figura IV.

portunamente regolando il funzionamento del refrigeramento, in realtà è chiaro che nella pratica ciò non si è ottenuto senza molte oscillazioni (1).

Infatti si sono presentati i seguenti casi:

1° La temperetura dell'aria esterna oscillando al disotto dei 23°, quella dell'aria sana è diminuita di 1. 5 a 4°;

2° La temperatura dell'aria esterna oscillando da 23° a 27°, la temperatura dell'aria sana è diminuita di 7°;

3° La temperatura dell'aria sana oscillando da 27° a 30°, la temperatura dell'aria sana è diminuita di 8° a 10°.

Questi vari casi sono, a mio avviso spiegabili così:

1° Se funziona l'apparecchio di refrigeramento e la temperatura esterna si aggira intorno ai 28°-30°, la temperatura dell'aria sana diminuisce di una diecina di gradi;

2° Se esso funziona intermittentemente o incompletamente, la temperatura dell'aria sana diminuisce più o meno irregolarmente. In ogni caso se la temperatura esterna si trova al disotto di 28° la temperatura dell'aria sana subisce delle oscillazioni irregolari;

3° Se la temperatura dell'aria esterna è al disotto di 25° e non si fa funzionare il sistema di inumidimento dell'aria, la temperatura dell'aria sana si mantiene di pochi decimi inferiore a quella esterna o di circa 1° quando si apra la porticina di comunicazione fra il sotterraneo e la camera dei ventilatori.

2. *Periodo invernale* (fig. V). — Nel secondo periodo in linea generale la temperatura dell'aria sana ha seguìto la curva dell'aria viziata.

La temperatura dell'aria sana si è aggirata intorno al 15°-16° con delle oscillazioni di poco più di un grado e quella dell'aria viziata intorno a 16°-18° anche essa con delle oscillazioni di poco più di un grado.

Non v'ha dubbio quindi che in questo secondo periodo l'aria immessa nella camera si è mantenuta pressochè nelle stesse condizioni di temperatura: le oscillazioni verificatesi non sono rilevanti.

Considerando la curva dell'aria sana in rapporto con quella dell'aria esterna appare evidente l'ottimo funzionamento del sistema di riscaldamento, poichè, anche quando la temperatura esterna si è di

---

(1) Ricordo qui che il Mengarini dopo l'esame di quanto si fa in aule artificialmente raffreddate e dalle esperienze preliminari fatte nell'aula di cui ci occupiamo, ritiene non doversi mai oltrepassare nel raffreddamento i 5 gradi sotto l'aria esterna.

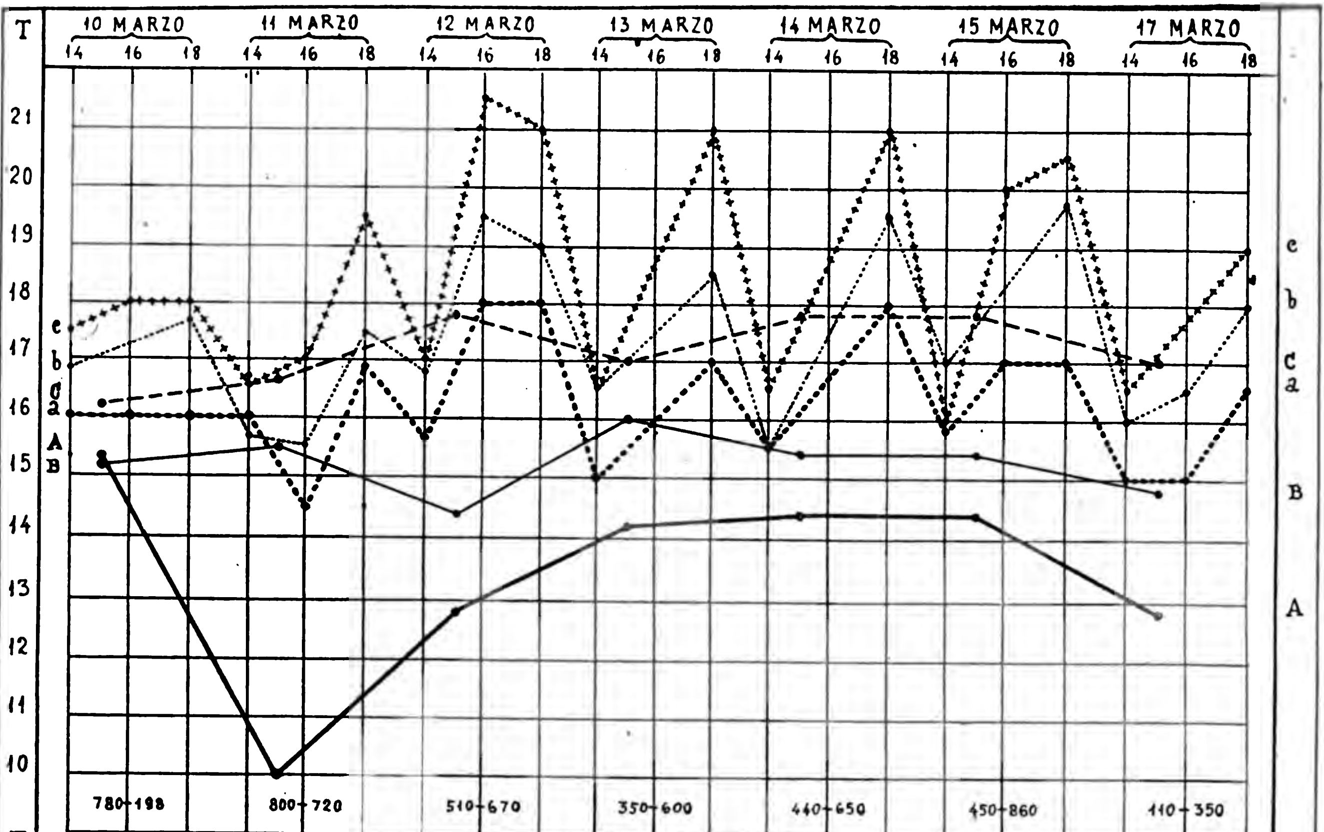


Figura V.

A Curva della temperatura dell'aria esterna.
B Id. id. id. sana.
C Id. id. id. viziata.
a Id. id. id. in corrispondenza del centro dell'Aula.
b Id. id. id. id. del banco della Presidenza.
c Id. id. id. id. della volta dell'Aula.

molto abbassata, quella dell'aria sana si è mantenuta nelle stesse condizioni; e così pure allorchè quella esterna ha raggiunto i 15°.

Considerando la curva dell'aria viziata in rapporto con le curve della temperatura prese nei vari punti della camera all'inizio delle sedute appare evidente che essa è superiore, salvo qualche volta, alla temperatura dei vari punti dell'aula presa negli stessi momenti; in ogni caso essa è sempre superiore alla temperatura del centro. Considerando però la temperatura dell'aula verso la fine delle sedute si vede come essa, specialmente in corrispondenza della volta e del banco della presidenza, si mantenga più elevata della temperatura dell'aria nella galleria di richiamo. Ciò per il fatto che spesso nell'emiciclo e alla presidenza si agglomera gran numero di persone, mentre quivi l'immissione dell'aria pura, fatta in proporzione del numero delle persone che vi stanno a sedere, è piccola.

Considerando ora il modo di diportarsi della temperatura dalle 14 alle 17 ed in ciascuna seduta, appare evidente che la temperatura dell'aria viziata alcune volte ha seguito la curva dell'aria sana, altre volte ha mostrato di tendere ad equilibrarsi con questa e altre volte ad innalzarsi non ostante che la stessa si abbassasse; altre volte infine è rimasta inferiore a quella dell'aria sana.

Questi fatti si spiegano così:

1° Se l'Aula si spopola, la temperatura dell'aria viziata tende a equilibrarsi con quella dell'aria sana;

2° Se nell'Aula cresce il numero delle persone (come successe il 12 marzo in cui da 510 divennero 670 e il 15 marzo in cui da 450 divennero 860) anche se la temperatura dell'aria sana si abbassa, quella dell'aria viziata si innalza (1);

3° Se le sedute vengono tenute in giornate piovigginose la temperatura dell'aria viziata ove il numero delle persone nell'aula sia piccolo (17 marzo) si abbassa.

B) *Stato igrometrico dell'aria sana e viziata.*

Come risulta dal progetto del Mengarini era stato calcolato che l'aria sana mediante il funzionamento degli spruzzatoi potesse giungere nell'Aula con un grado di umidità relativa eguale a 0.80:

---

(1) Come conseguenza si potrebbe rilevare chè in certe giornate in cui è necessario il riscaldamento, sarebbe opportuno dopo avere introdotto aria calda per un certo tempo, introdurre aria lievemente riscaldata o raffreddata.

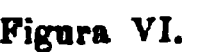
però era stato anche progettato l'impianto di un sistema di disidratamento che poi nòn venne eseguito.

Ora io ho studiato bene fino dall'inizio delle mie ricerche il modo di diportarsi dell'umidità relativa presa nelle due gallerie, mettendola in confronto con quella dell'aria esterna.

Riassumo nel quadro seguente i dati trovati aggiungendo quelli della corrispondente umidità massima, assoluta e del *deficit* di saturazione:

Umidità relativa massima, assoluta e deficit *di saturazione (ore 15).*

Data	Aria sana					Aria viziata				
	Umidità relativa	Temperatura	Umidità massima	Umidità assoluta	*Deficit* di saturazione	Umidità relativa	Temperatura	Umidità massima	Umidità assoluta	*Deficit* di saturazione
5 giugno 1901. .	86	19. 6	16. 179	13.983	2. 196	80	21. 0	18. 174	14. 539	3 635
7 » . .	83	18. 1	15. 248	12. 596	2. 652	82	19. 9	16. 182	13.269	2. 913
14 » .	91	20. 1	17. 149	15. 606	1. 543	84	22.6	19. 260	16.178	3. 082
15 » . .	87	20. 3	17. 151	15. 221	1 930	85	22. 5	19. 259	16. 370	2. 889
17 » . .	71	20.4	17. 152	12. 187	4. 065	68	20. 3	17. 151	11. 663	5. 488
18 » . .	68	18. 4	15. 251	10. 370	4. 881	68	18. 4	15. 251	10. 370	4. 981
19 » . .	56	16. 9	15. 539	7. 582	7. 957	61	16. 3	13. 534	8. 256	5. 278
20 » . .	69	19. 1	16. 174	11. 160	5. 014	77	20. 0	17. 148	13. 204	3. 944
21 » . .	80	18.5	15. 252	12. 201	3. 051	64	20. 9	17. 157	10. 980	6.177
22 » . .	89	19. 3	16. 176	14. 397	1. 779	87	22. 1	19. 254	16. 751	2. 503
24 » . .	91	18. 3	15. 250	13. 877	1. 373	83	21. 9	18. 184	15 093	3. 091
26 » . .	93	18 7	15. 253	14. 185	1. 068	77	22. 3	19. 256	14. 827	4. 429
27 » . .	91	18. 3	15. 250	13. 877	1. 373	67	22. 1	19. 254	12. 900	6. 354
28 » . .	91	18. 4	15. 251	13. 878	1. 373	69	22. 3	19. 256	13. 287	5. 969
10 marzo 1902. .	32	15. 2	12. 740	4. 077	8. 663	60	16. 2	13. 534	8. 120	5. 414
11 » . .	30	15. 6	12. 744	3. 823	8. 921	47	16. 6	13. 537	6. 362	7. 175
12 » . .	32	14. 4	11. 990	3. 837	8. 153	49	17. 8	14. 374	7. 043	7. 331
13 » . .	41	16. 0	13. 532	5. 548	7. 984	59	17. 0	14. 367	8. 476	5. 891
14 » . .	49	15. 4	12. 742	6. 244	6. 498	59	17. 8	14. 374	8. 480	5. 894
15 » . .	47	15. 4	12. 742	5. 989	6. 753	65	17. 8	14. 374	9. 343	5. 031
17 » . .	48	14. 8	11. 994	5. 757	6. 237	76	17. 6	14. 367	10 919	3. 448



Curva dell'umidità relativa.
Nel Periodo estivo.
Nel Periodo invernale
90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20
Curva dell'umidità relativa dell'aria esterna.
» » » » viziata.
» » » » sana.

Figura VI.

Considerando questi dati, e stabilendo con essi una grafica (fig. VI) si vede:

1° Che nessun rapporto fisso esiste tra il modo di comportarsi dell'umidità relativa presa nelle due gallerie e quella dell'aria esterna.

2° Che l'umidità relativa dell'aria sana spesso nel periodo estivo supera 0. 80 e anche 0. 90, ciò che indubbiamente dipende dal mancato impianto del sistema di disidratamento.

3° Che in ogni caso l'aria viziata ha una umidità relativa inferiore a quella dell'aria sana, se questa viene immessa nell'aula con un'umidità relativa superiore a 0. 80, superiore od eguale, quando l'aria sana viene immessa con un'umidità relativa tra 0. 60 e 0. 70. e questo è appunto il fatto che costantemente si ripete nel periodo invernale.

Mi sembra quindi di poter concludere che nell'estate, in cui in genere il numero delle persone nell'aula è piccolo e la ventilazione molto attiva, il vapore acqueo emesso con l'aria espirata e dal corpo non riesce ad aumentare il grado igrometrico, che invece diminuisce per l'aumento di temperatura dovuto al calore trasmesso dall'esterno all'interno attraverso il fabbricato ed irradiato dal corpo umano.

Nell'inverno invece e per la diminuita ventilazione e per la maggiore umidità emessa specialmente dagli abiti e per il raffreddamento che subisce l'aria per trasmissione di calore dall'interno all'esterno, il grado igrometrico aumenta costantemente.

Perciò nel periodo estivo l'umidità relativa dell'aria viziata è quasi sempre inferiore a quello dell'aria sana e costantemente superiore a quello dell'aria esterna.

Nel periodo invernale invece l'umidità relativa dell'aria viziata è sempre superiore a quello dell'aria sana ed ora superiore ed ora no a quella dell'aria esterna.

Riunendo poi insieme i dati riguardanti all'umidità relativa presa di ora in ora dalle 15 alle 17 come si ha il seguente quadro:

Umidità relativa, dell'aria sana e viziata in confronto con quella dell'aria esterna prese in diverse ore.

DATA	Umidità relativa								
	Aria sana			Aria viziata			Aria esterna		
	ore 15	ore 16	ore 17	ore 15	ore 16	ore 17	ore 9	ore 15	ore 21
5 giugno 1901	86	85	87	80	81	87	82	63	65
7 »	83	87	84	83	83	89	54	40	48
14 »	91	90	83	84	83	92	57	57	79
15 »	87	87	85	85	81	87	81	53	44
17 »	71	69	60	68	71	67	47	44	66
18 »	68	60	60	68	69	60	50	46	71
19 »	56	61	65	61	65	65	60	34	75
20 »	69	69	65	77	74	65	54	55	63
21 »	80	81	77	64	64	59	43	43	57
22 »	89	89	89	87	76	65	56	49	50
24 »	91	91	93	83	71	65	43	37	76
26 »	93	93	89	77	77	70	68	45	78
27 »	91	91	93	67	67	62	69	35	60
28 »	91	91	93	69	72	65	48	34	81
10 marzo 1902	32	33	30	60	53	67	76	23	47
11 »	30	33	29	47	53	52	25	55	35
12 »	32	38	40	49	58	55	41	44	69
13 »	41	39	52	59	59	61	66	50	84
14 »	49	42	54	59	62	60	67	48	65
15 »	47	47	56	65	64	69	63	52	76
17 »	48	42	50	76	62	80	57	21	57

Dal quadro precedente appaiono evidentissimi i seguenti fatti:

1° Finchè l'U. R. dell'aria sana si mantiene superiore a 0. 80, quella dell'aria viziata si mantiene costantemente inferiore o un po' più bassa per risalire tutte le volte che quella dell'aria sana discende intorno a 0. 80.

2° Finchè l'U. R. dell'aria sana si mantiene tra 0. 60 e 0. 70 (o anche più bassa) quella dell'aria viziata tende a mantenersi più alta, fatto che si ripete anche quando l'umidità relativa dell'aria sana sta tra 0. 70 e 0. 80.

Quindi durante le sedute l'umidità relativa subisce delle oscillazioni che prese in complesso pare che seguano una certa legge.

Però appare evidente che tanto nel periodo estivo quanto nel periodo invernale l'impianto non permette di mantenere l'aria nell'Aula nelle condizioni igieniche preferibili cioè intorno a 0. 80. Infatti solo una volta tali condizioni si sarebbero verificate e precisamente nel periodo estivo in una delle sedute più numerose, quella del 22 giugno, in cui fu presentato l' ordine del giorno Riccio sul bilancio dell'interno, con circa 1000 persone nell'aula. Durante questa seduta l'U. R. dell'aria sana variò da 80 a 77 e quella dell'aria viziata seguì perfettamente la curva della precedente con 16 o 17 gradi di differenza: l'U. R. esterna era allora intorno a 40. Nelle altre sedute si ebbero delle oscillazioni che si sarebbero evitate se si fosse avuto il progettato apparecchio di disidratamento. Anche il 26 giugno si notò una netta correlazione sul modo di diportarsi della U. R. dell'aria sana e dell'aria viziata per non variare di alcuno dei fattori sopra ricordati: rimase però sempre nell'aria sana un elevato grado di U. R.; del resto spiegabile perchè l'aria esterna lo possedeva già intorno a 70.

Quindi d'accordo con gli studi del Mengarini « il disidratamento dell'aria in estate va regolato precisamente come l'inumidimento in inverno, d'ora in ora, a seconda delle condizioni atmosferiche, colla scorta degli istrumenti che fanno capo alla camera di controllo.

Quando è stabilita la temperatura minima, che si vuole ottenere, è implicitamente stabilito il grado di umidità che l'aria potrà contenere e che essa assumerà, secondo le leggi fisiche immutabili, nella misura che le spetta pel grado igrometrico che essa aveva nell'atmosfera.

Perciò il tenore di vapor acqueo dipenderà *unicamente dallo stato iniziale igrometrico* e termico finale, che si vuole raggiungere, e non dalla via che si è seguita ».

Cap. II.

Esame chimico.

È noto che l'esame chimico dell'aria ha una grandissima importanza per stabilire il viziamento dell'aria stessa, specialmente nei luoghi molto affollati e che si è convenuto di dedurre il viziamento dell'aria dalla quantità di acido carbonico che vi si rinviene, seguendo in questo le indicazioni di vari autori a cominciare da quella del Pettenkofer. Questi avrebbe infatti stabilito che il limite per la tollerabilità della quantità di acido carbonico negli ambienti abitati, sarebbe il doppio di quella che si trova ordinariamente nell'aria, cioè il 0. 6 per cento: l'1 per cento, secondo l'autore rappresenterebbe il limite massimo, ma già indicherebbe una corruzione dell'aria non tollerabile.

Sebbene non siano tutti però d'accordo su questi limiti, e recenti autori tendano anzi a concludere, per dirla col Sanarelli e col Biffi (1), che si sia giunti anche per l'acido carbonico *a quelle stesse esagerazioni che caratterizzavano tempo addietro i giudizi igienici sulle acque potabili, in base ad analisi sommarie ed inconcludenti, ma pur tuttavia stimate come decisive;* ad ogni modo tenendo conto del concetto oramai diffuso sulla importanza dell'acido carbonico come indice del viziamento dell'aria, l'ho ricercato quantitativamente in confronto con l'ossigeno e anche con le sostanze organiche.

La ricerca dell'ossigeno era specialmente indicata per il fatto che esso nell'atmosfera ordinaria si mantiene in una quantità pressochè costante, per cui poteva avere una certa importanza lo studiare le sue variazioni nell'aria viziata in confronto con l'aria sana.

La ricerca quantitativa delle sostanze organiche quantunque *a priori* si potesse considerare superflua, tuttavia l'ho fatta, perchè

---

(1) Gli autori vengono a queste conclusioni, fra le altre: per la superficie polmonale possono eliminarsi, regolarmente, sostanze gassose o volatili organiche o inorganiche, presenti nel tubo digestivo; l'esalazione polmonale di qualcuna di tali sostanze gassose (H_2S) non si trova in alcun rapporto diretto con la esalazione del CO_2, anzi quanto maggiore appare l'esalazione del H_2S, tanto minore risulta quella del CO_2, ecc.

E ne deducono che:

1° il criterio stabilito dal Pettenkofer per determinare il limite di tolleranza di un'atmosfera confinata, non riposa sopra nozioni precise, circa la esalazione polmonale delle sostanze gassose volatili, considerate come nocive;

2° l'ordinario valore-limite dell'acido carbonico, come indice dell'inquinamento atmosferico, non può avere quindi che una scarsa importanza pratica. (Questi Annali, 1902, pag. 90).

alcuni hanno creduto di poter stabilire un rapporto costante tra la quantità di esse e la quantità di acido carbonico nelle arie corrotte.

Siccome poi nell'aria degli ambienti confinati si possono trovare altre sostanze che indicano un viziamento dell'aria stessa, generalmente accidentale, così ho anche ricercate alcune di queste sostanze, però soltanto qualitativamente. Presi quindi in considerazione l'ossido di carbonio, il cui limite massimo della innocuità per l'uomo sarebbe inferiore al 0. 05 per cento; l'idrogeno solforato il quale all'odorato umano sarebbe già sensibile all' 1 su 1,700,000 e che rivela generalmente la provenienza dell'aria da cloache o da stabilimenti industriali e così pure l'ammoniaca, gli acidi nitroso, nitrico e cloridrico, ecc.

Quindi nell'esame chimico dell'aria procedetti:

1° all'esame quantitativo dell'ossigeno, dell'acido carbonico e delle sostanze organiche;

2° all'esame qualitativo dell'ossido di carbonio, dell'ammoniaca, del cloro, dell'acido nitrico, dell'acido nitroso e dell'idrogeno solforato.

La determinazione dell'ossigeno venne fatta col solito metodo cosidetto per assorbimento. Introdotto un dato volume d'aria in una campanella graduata posta in un bagno di mercurio, facevo assorbire l'ossigeno dal pirogallato potassico non dimenticando naturalmente di fare tutti i dovuti calcoli e di seguire le indicazioni tecniche prescritte.

La determinazione dell'acido carbonico venne fatta secondo il metodo del Pettenkofer, cioè versando nel lungo tubo che porta il nome dell'autore, 250 cmc. di barite, di cui ne prelevava 25 (coi quali riempiva completamente una bottiglia a perfetta tenuta) per determinarne il titolo. Subito dopo facevo funzionare l'aspiratore annesso all'apparecchio medesimo, in modo d'aspirare 20 litri all'ora; riaprivo quindi il tubo di Pettenkofer, prelevavo altri 25 cmc. di soluzione di barite, coi quali riempivo un'altra piccola bottiglia a perfetta chiusura e recatala in laboratorio ne determinavo il titolo in confronto a quello della primitiva soluzione di barite; quindi cogli opportuni calcoli stabilivo la quantità d'acido carbonico per mc. contenuta nell'aria.

La determinazione delle sostanze organiche venne eseguita facendo gorgogliare dell'aria attraverso una serie di bocce a gorgogliamento (mai meno di due) poste entro gli adatti bagnomaria cilindrici, riscaldati per mezzo di lampade ad alcool. Entro le bocce a gorgogliamento ponevo una soluzione di permangato potassico acidificata con acido solforico e prima titolata in laboratorio; fattovi gorgogliare un certo numero di litri d'aria in ragione di 20 litri all'ora, toglievo le bocce a gorgogliamento, chiudevo ermeticamente con cappucci di gomma l'orifizio delle tubulature e le portavo in laboratorio per una nuova titolazione. Dopo di che, con gli opportuni calcoli, deducevo la quantità delle sostanze organiche per mc. d'aria.

La ricerca d'ossido di carbonio venne eseguita facendo gorgogliare un

gran numero di litri d'aria (100-150 per volta). in non meno di due bottiglie a gorgogliamento, messe in comunicazione una coll'altra (immerse in bagnomaria cilindrici riscaldati per mezzo di una lampada ad alcool) e contenenti una soluzione di cloruro di palladio, il quale, come si sa, viene ridotto dall'ossido di carbonio che separa il metallo sotto forma di una polvere nera (1).

La ricerca dell'idrogeno solforato, veniva fatta facendo passare un gran numero di litri d'aria attraverso ad una carta bibula bagnata con una soluzione di acetato di piombo, adattata a tamburello all'orifizio di un tubo di vetro svasato a cono, approffittando della proprietà che ha l'idrogeno solforato di annerire la detta carta.

Per la ricerca di tutti gli altri composti (ammoniaca, acido nitroso e nitrico, cloro e acido cloridrico), facevo gorgogliare un gran numero di litri d'aria attraverso uno o due tubi di Pettenkofer o in grandi bocce a gorgogliamento, contenenti acqua distillata.

L'acqua veniva poi tolta dai relativi recipienti versata e chiusa in bottiglie pulitissime, portata in laboratorio e, divisa in varie parti, sottoposta alla ricerca delle sostanze sopraricordate coi metodi che trovansi indicati in tutti i trattati di chimica applicata all'igiene.

Ciò posto, riassumo in un quadro i risultati ottenuti nei due periodi estivo e invernale, tralasciando tutti quelli trovati prima del 5 giugno, poichè non sempre prima di quest'epoca potei contemporaneamente procedere alla determinazione quantitativa dell'ossigeno, dell'acido carbonico e delle sostanze organiche, non avendo ancora potuto disciplinare l'andamento delle esperienze, come era mio desiderio.

---

(1) Questo metodo, che per se stesso non è rigoroso, perchè si sa che anche gli idrocarburi eventualmente presenti nell'atmosfera, possono ridurre il cloruro di palladio, nel caso speciale però poteva essere considerato abbastanza esatto, non avendo mai rintracciato di tali gas eccetto in due sole esperienze, come sarà detto più oltre.

DATA	Acido carbonico °/ₒ nella galleria dell'aria		Sostanze organiche °/ₒ nella galleria dell'aria	
	sana	viziata.	sana	viziata
5 giugno 1901	0.27	0.49	0.0286	0.0143
7 »	0.31	0.76	0.0230	0.0475
14 »	0.28	0.62	0.0133	0.0139
15 »	0.27	0.51	0.0004	0.0168
17 »	0.26	0.73	0.0208	0.0223
18 »	0.32	0.78	0.0336	0.0272
19 »	0.38	0.78	0.0250	0.1338
20 »	0.27	0.44	0.0113	0.0107
21 »	0.27	0.45	0.0230	0.0286
22 »	0.31	0.44	0 0250	0 0168
24 »	0.32	0.78	0.0254	0.0149
26 »	0.31	0.59	0.0125	0.0101
27 »	0.28	0.30	0.0004	0.0133
28 »	0.30	0.30	0.0223	0.0168
10 marzo 1902	0.28	0.78	0 0398	0.2480
11 »	0.29	0.48	0.0184	0.0130
12 »	0.35	0.42	0.0156	0.0004
13 »	0.36	0.42	0.0088	0.0029
14 »	0.36	0.48	0.0184	0.0104
15 »	0.29	0.56	0.0156	0.0088
17 »	. .	. .	. .	. .

Nel quadro precedente, ho omesso a bella posta le finche per l'ossigeno, giacchè esso nell'aria interna sana si mantenne costantemente nelle proporzioni in cui si trova nell'aria esterna (20-21 %) e d'altra parte le oscillazioni della sua percentuale, fra aria sana ed aria viziata furono così poco rilevanti che non permettono di trarre considerazioni di indole generale; solo nelle giornate di sedute affollate e protratte, si potè notare una leggera diminuzione della percentuale di ossigeno (20-20,5) come il 22 giugno 1901 e il 15 marzo 1902 quando nell'aula eranvi circa 1000 persone coincidendo la discussione sulla politica interna.

Dal quadro intanto si rileva:

1) riguardo all'acido carbonico, che esso nell'aria sana ha oscillato dal minimo del 0.26 % al massimo di 0.38 nel periodo estivo e dal minimo di 0.28 al massimo del 0.36 nel periodo invernale: nell'aria viziata poi si è sempre trovato una quantità maggiore che nell'aria sana da un minimo di 0.30 al massimo di 0.78.

In quanto al limite tollerabile non è mai stato superato nell'aria sana: nell'aria viziata durante il periodo estivo è stato superato 5 volte di 0.13–0.18 e 1 volta di 0.18 durante il periodo invernale.

Quindi a giudicare da questi dati, in genere il viziamento dell'aria per l'acido carbonico non ha sorpassato il limite tollerabile, il che induce a credere che quando qualche volta esso viene sorpassato, sopravvengono delle cause che debbono essere ricercate per essere evitate.

Per quel che mi consta, ciò succede specialmente quando la seduta si protrae, senza che i deputati lascino numerosi i seggi e nel contempo funziona un solo ventilatore per l'aria sana e uno solo per il richiamo dell'aria viziata. Quindi quando ciò è successo ciò si sarebbe potuto evitare benissimo facendo funzionare anche l'altro ventilatore e l'altro estrattore.

Debbo poi far notare che la maggior quantità di acido carbonico nell'aria sana, l'ho trovata tutte le volte che veniva aspirata dell'aria dal sotterraneo per l'apertura della porta della camera dei ventilatori.

Riguardo poi alle sostanze organiche è bensì vero che il loro quantitativo ha subìto delle oscillazioni sia nell'aria sana sia nell'aria viziata senza alcuna regola; però in genere, si può ritenere che esso è stato superiore nell'aria sana durante il periodo estivo, inferiore durante l'invernale.

Non riporto alcuna tabella riguardante i risultati delle ricerche

sugli altri gas e sulle sostanze che accidentalmente avrebbero potuto corrompere l'aria, perchè esse riuscirono del tutto negative (1).

Soltanto durante il periodo invernale, una volta venne ridotto il cloruro di palladio, ma questo fatto fu presto spiegato perchè, pare, ci fosse stata una fuga di gas, il quale sarebbe stato aspirato in seguito all'apertura della porticina di comunicazione colla camera dei ventilatori.

Un'altra volta (17 marzo 1902) si ripetè lo stesso fatto nell'aria viziata, ma di esso non si riuscì a scoprire la causa: probabilmente proveniva dalla annessa officina elettrica, con motore a gas di 12 cavalli, la quale ha comunicazioni col sotterraneo che dovrebbero stare chiuse.

Cap. III.

Esame batteriologico.

A — *Tecnica.*

Prima di procedere all'esame batteriologico dell'aria della camera, mi ero accinto ad uno studio comparativo dei vari metodi, indicati per l'esame batteriologico dell'aria, e i resultati di tale lavoro di controllo mi condussero a concludere, che di tutti i procedimenti indicati quelli che davano i migliori risultati erano quello di Strauss-Wurtz, quello di Sanfelice e quello per mezzo dei filtri, insolubili (Petri) e solubili (Miquel).

Il primo procedimento non era però applicabile al caso mio perchè dovendo far durare il gorgogliamento dell'aria nella gelatina per qualche ora, bisognava tenerla troppo a lungo a bagno maria, ciò che non poteva a meno di portare una moltiplicazione dei germi stessi e condurre ad erronei risultati; d'altro canto bastava lo sviluppo di pochi fluidificanti per inutilizzare le culture arrotolate.

Per il procedimento del Sanfelice, necessitava eseguire l'impianto di una serie di tubi a gorgogliamento che mal si prestavano al trasporto dal laboratorio al luogo dell'esperimento: quivi poi (volendo evitare questo inconveniente) non era possibile, dovendo in poche ore far tante ricerche, procedere anche a delle semine a piatto. D'altro canto dovendo far gorgogliare dell'aria, attraverso alla soluzione acquosa glicerica posta nei tubi sarebbe abbisognato regolare molto bene, come per l'esame chimico, la velocità dell'aspirazione

(1) Con questo però non voglio escludere in maniera assoluta la presenza nell'aria di qualcuna delle menzionate sostanze; giacchè queste potevano trovarsi in tracce così piccole da non essere rivelate coi metodi di ricerca da me applicati.

per non asportare del liquido, ciò che avrebbe importata una non piccola inevitabile perdita di tempo.

Il metodo del Petri avrebbe permesso di aumentare la velocità dell'aspirazione (almeno entro a certi limiti) e avrebbe evitato l'inconveniente della moltiplicazione dei germi durante l'aspirazione: però le piastre fatte coi granelli di sabbia mescolati alla gelatina rendevano troppo difficoltoso il conteggio delle colonie, oltre che spesso alcuni granelli, trasportando insieme vari germi non permettevano che le colonie si sviluppassero separatamente, specie quelle dei fluidificanti.

Fra i metodi del Miquel con filtri a materiali solubili certamente quello dei filtri di zucchero ovviava anche quest'ultimo inconveniente, specialmente così com› è stato recentemente perfezionato dal Valenti e dal Ferrari (i quali usarono un tubo di Petri riempito di saccarosio, diviso in due colonne di cui la superiore più lunga dell'inferiore): rimanevano però ancora due inconvenienti, l'uno derivante dal dover far pervenire nella gelatina le reticelle metalliche trattenenti le colonne di zucchero, l'altro di dover distribuire in un gran numero di piastre, lo zucchero per evitare di zuccherare troppo fortemente la gelatina (nelle soluzioni zuccherine concentrate molti germi non si sviluppano, mentre si favorisce lo sviluppo delle muffe); dippiù anche facendo la distribuzione dello zucchero in diverse piastre, i germi non si separano sempre bene, sicchè non è difficile trovare qualche piastra in cui si ha una completa fusione della gelatina, prima che si possa procedere alla conta delle colonne.

Ad evitare gli inconvenienti dei vari metodi e per semplicizzare la tecnica mi servii allora di un procedimento diverso (fig. VII).

Feci dei filtri di saccarosio polverizzato (a grani di mezzo millimetro) a colonna intera, alta circa cm. 5 e del diametro di un centimetro e trattenni la colonna per mezzo di un disco egualmente di saccarosio, a sua volta trattenuto da un tappo di gomma forato, il quale veniva introdotto in un tubo di vetro (pescante in glicerina al 5 per cento contenuta in una fiaschetta di Rosaheggi) naturalmente trattenuto al collo della medesima per mezzo di un tappo di gomma forato.

Questo tappo porta poi un altro foro attraverso a cui si fa passare un altro tubo di vetro che si arresta all'interno al collo della fiaschetta e all'esterno è piegato ad angolo e porta una dilatazione a bolla ripiena di cotone.

In sito portavo delle fiaschette contenenti glicerina al 5 per cento coi loro tappi di gomma forniti dei due tubi, di cui il più lungo a sua volta fornito dal tappo di gomma da innestarsi nel filtro; il tutto avvolto naturalmente in carta bibula era stato sterilizzato nell'autoclave per mezz'ora almeno.

D'altro canto portavo ancora i filtri di saccarosio coi due orifizi chiusi con tappi d'ovatta e provenienti da una stufa a secco dove si erano tenuti per un'ora alla temperatura di 150°, a cui si erano portati lentamente per evitare la caramellizzazione dello zucchero.

Al momento opportuno si toglievano la carta bibula avvolgente la fiaschetta, i due tappi di ovatta dal filtro e si innestava questo, dal lato del disco di zucchero, al tappo di gomma adattato al tubo più lungo della fiaschetta; si

metteva in comunicazione l'altro tubo della fiaschetta, coll'aspiratore rappresentato dalla pompa del Petri, e si aspiravano per 2-3 ed anche 4 volte 100 litri in mezz'ora.

Si chiudevano quindi le aperture del filtro con tamponi di ovatta sterilizzata (che si portavano a parte in apposita scatola di rame) e del pari con un altro tampone si chiudeva l'orifizio della fiaschetta dopo avere tolto il tappo di gomma coi due tubi.

Così fiaschetta e filtro si portavano in laboratorio, dove si fluidificava a bagno maria della gelatina al 15 per cento (fatta con brodo di carne peptonizzato contenente l'1 per cento di cloruro sodico) che si teneva in provette in quantità di cmc. 10; si versava poi questa gelatina nella fiaschetta che subito si disponeva in piano in modo da farne una piatta.

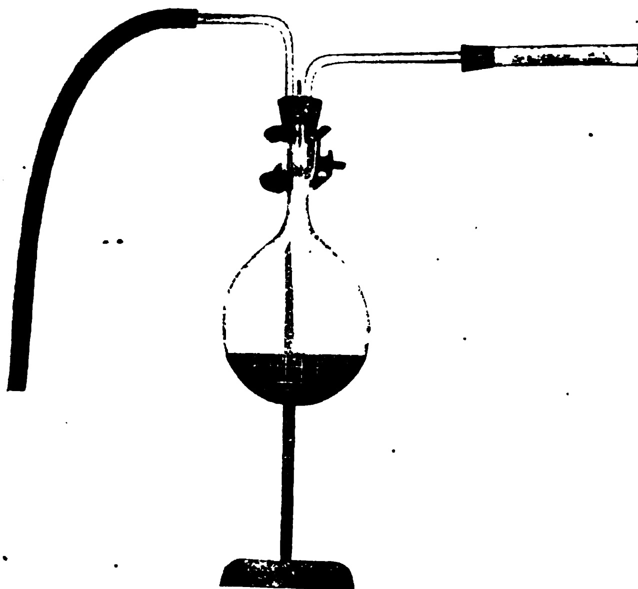


Figura VII.

D'altro canto toglievo i due tappi d'ovatta dal filtro, con una bacchetta di vetro sterilizzata, ad estremi non arrotondati, spingevo il saccarosio in una o due grandi capsule di Petri a bordi alti, come quelle dei cristallizzatori e nella stessa capsula versavo 100 cmc. di gelatina fluidificata a bagno maria a 40° e ottenuta la soluzione del saccarosio la lasciavo solidificare.

Il tubo di vetro del filtro chiudevo poi da un lato con un tappo di gomma sterilizzato nella stufa, avvolto in carta bibula, e versatovi dentro una piccola quantità di gelatina sterile, chiudevo l'altro estremo con un tappo d'ovatta sterilizzato; quindi facevo una cultura arrotolata all'Esmarck.

Con questo procedimento venivo ad ottenere lo sviluppo di tutti i germi coltivabili in gelatina, poichè quelli che potevano sfuggire al filtro di zucchero rimanevano nella soluzione di glicerina al 5 °/₀, e quelli che eventualmente rimanevano attaccati al tubo di vetro del filtro si mettevano in evidenza nella coltura arrotolata.

La maggior parte dei germi poi venivano a svilupparsi nelle grandi piatte senza che ciò venisse ostacolato dalla presenza di un'eccessiva quantità di zucchero, giacchè dai calcoli fatti la gelatina veniva a contenerne il 2 e tutt'al più il 2,5 %.

Vennero anche ricercati dei batteri patologici per l'uomo, specialmente durante le sedute più numerose.

A tal uopo invece delle fiaschette di Rosaheggi si usarono dei grandi provettoni contenenti 50 cmc. di glicerina al 5 %, a cui nello stesso modo si adattarono i filtri di zucchero attraverso ai quali si aspirarono 100-500 litri di aria (1).

In laboratorio poi si sciolsero i filtri di saccarosio nell'acqua glicerinata e di questa si prelevarono determinate quantità che si innestarono in brodo lattofenolftaleinizzato di Abba e nei brodi fenicocloridrici Parietti.

Soltanto una volta si ritrovò un germe patogeno avente molti dei caratteri del *bacterium coli:* riuscì del tutto negativa la ricerca del *bacterium tiphi.*

Colla medesima acqua zuccherata si ricercarono anche dei *vibrioni* innestandola in brodo di Dunham-Koch con risultato assolutamente negativo.

Il residuo centrifugato inoculato in cavie non permise mai di trovare il *bacillo della tubercolosi* nè nell'aria sana, nè nell'aria viziata.

Degli animali (cavie) inoculati sottocute pochi morirono: di 18, due pei *pseudoedema maligno,* uno per *pneumobacillo*, uno per *diplococco.*

Ciò posto ecco riassumo nei seguenti quadri i risultati dell'esame batteriologico quantitativo e qualitativo nei due periodi estivo ed invernale.

---

(1) Vedi nella figura III il secondo apparecchio segnato con la lettera C.

DATA	Microrganismi trovati in 1 mc. di aria sana						Microrganismi trovati in 1 mc. di aria viziata					
	Batteri					Muffe	Batteri					Muffe
	Totale	fluidificanti	non fluidificanti	cromogeni	non cromogeni		Totale	fluidificanti	non fluidificanti	cromogeni	non cromogeni	
24 maggio 1901	368	169	199	21	347	101	459	199	260	9	450	90
25 »	591	302	289	..	591	99	598	278	320	11	587	30
26 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
27 »	841	301	540	3	838	83	328	217	111	7	321	27
28 »	320	102	218	..	320	55	299	107	192	30	269	31
29 »	210	96	114	..	210	59	425	218	207	21	404	21
30 »	58	15	43	..	58	32	190	90	100	6	184	56
31 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
1° giugno 1901	160	71	89	..	160	71	291	188	103	18	273	7
2 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
3 »	496	281	215	..	496	26	315	144	171	22	293	49
4 »	41	20	21	..	41	11	271	164	107	..	271	109
5 »	702	406	296	1	701	25	409	299	110	..	409	59

DATA	Microrganismi trovati in 1 mc. di aria sana						Microrganismi trovati in 1 mc. di aria viziata					
	Batteri					Muffe	Batteri					Muffe
	Totale	fluidificanti	non fluidificanti	cromogeni	non cromogeni		Totale	fluidificanti	non fluidificanti	cromogeni	non cromogeni	
6 giugno 1901	896	321	575	12	884	39	521	295	226	27	494	77
7 »	536	210	326	25	511	47	762	401	361	10	752	9
14 »	10.224	96	10.128	7	10.217	232	533	40	493	21	512	164
15 »	292	1	291	9	283	77	400	8	392	15	385	48
16 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
17 »	351	39	312	11	341	33	190	.	190	..	190	1
18 »	40	8	32	9	31	86	93	49	44	47	46	17
19 »	105	81	24	..	105	29	1.307	104	1.203	54	1.253	16
20 »	452	20	432	..	452	10	120	37	83	15	105	28
21 »	488	232	256	7	481	14	456	27	429	..	456	27
22 »	168	45	123	14	154	31	1.298	..	1.298	21	1 277	31
23 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
24 »	312	29	263	17	295	12	1.121	1.080	41	111	1.010	103

DATA	Microrganismi trovati in 1 mc. di aria sana						Microrganismi trovati in 1 mc. di aria viziata					
	Batteri					Muffe	Batteri					Muffe
	Totale	fluidificanti	non fluidificanti	cromogeni	non cromogeni		Totale	fluidificanti	non fluidificanti	cromogeni	non cromogeni	
25 giugno 1901	43	12	31	9	34	11	468	231	237	27	441	80
26 »	128	90	38	..	128	12	272	5	267	7	265	135
27 »	115	10	105	..	115	69	387	25	362	15	372	304
28 »	58	1	57	2	56	47	102	7	115	30	82	9
10 marzo 1902	380	250	130	14	366	90	∞	130	∞	14	∞	?
11 »	235	55	180	31	204	90	255	185	70	7	248	160
12 »	365	80	285	70	295	75	390	140	250	1	389	300
13 »	215	145	170	37	178	220	325	135	190	..	325	190
14 »	545	460	85	6	539	110	420	385	35	..	420	70
15 »	120	50	70	14	106	35	760	270	490	40	720	45
16 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
17 »	350	205	145	21	329	180	95	55	40	5	90	25

Esame qualitativo

I germi ritrovati furono i seguenti:

1) nel periodo estivo:

NELL'ARIA SANA:

B. subtilis.
» *megaterius.*
» *mesentericus vulgatus.*
» *radicosus.*
» *viscosum.*
» *zopfi.*
» *luteum.*
» *liquefaciens.*
» *florescens liquefaciens*
» » *non liquefaciens.*
Micrococus candicans.
» *luteus.*
Sarcina lutea.
» *alba.*
Streptotrix alba.
» *pluricolor.*
Oidium.
Penicillum glaucum.

NELL'ARIA VIZIATA:

B. subtilis.
» *viscosum.*
» *pneumoniae.*
» *mucosum.*
» *album.*
» *liquefaciens.*
» *fluorescens liquefaciens.*
Micrococus roseus.
Tetragenus albus.
Sarcina alba.
Streptotrix alba.
Aspergillus albus.
» *glaucus.*
Penicillum glaucum.

2) nel periodo invernale:

NELL'ARIA SANA:

B. mesentericus vulgatus.
» » *fuscus.*
» *subtilis.*
Botritis.
Oidium.
Aspergillus glaucus.
» *niger.*
Penicillum glaucum.

NELL'ARIA VIZIATA:

B. pneumoniae.
» *mesentericus vulgatus.*
» *viscosum.*
Streptotrix alba.
Penicillum glaucum.

B. — *Deduzioni.*

1° *Dall'esame quantitativo.* Da questo appare che il numero dei germi per mc. d'aria ha subito oscillazioni più o meno notevoli, alcune volte sommando a varie centinaia ed anche a migliaia, altre volte a poche diecine. E ciò sia nell'aria sana che nell'aria viziata, tanto nel periodo estivo che nel periodo invernale: soltanto, in massima, il numero dei germi contenuto per mc. nell'aria sana si è dimostrato inferiore a quello contenuto nell'aria viziata.

Considerando ora le grandi oscillazioni notate da un giorno all'altro nel numero dei germi in rapporto con alcune condizioni inerenti al funzionamento del sistema di ventilazione, al numero delle persone nell'aula e alle condizioni metereologiche esterne, ho potuto trovare che il numero dei germi per mc. d'aria fu molto elevato nell'aria sana, nei giorni in cui fu a lungo tenuta aperta la porticina di comunicazione tra il camino di presa e i sotterranei. Nell'aria viziata fu molto elevato quando il numero delle persone nell'aula fu molto grande, cioè dal 17 al 22 giugno 1901 e dal 10 al 15 marzo 1902, tenendo, si comprende, calcolo del numero minore dei germi nel periodo invernale e del numero maggiore nel periodo estivo, e nei pomeriggi in cui piovve, come successe il 19 giugno 1903, nel quale giorno si trova il massimo dei germi per mc., coincidendo anche una seduta molto numerosa.

2. *Dall'esame qualitativo.* — Da questo appare evidente lo scarso numero di specie riscontrate, sia nel periodo estivo che nel periodo invernale: però risalta netta la differenza fra questi due periodi riguardo al numero delle specie.

Infatti nel periodo invernale nell'aria sana non si trovarono che muffe e pochi batteri sporigeni: mancarono assolutamente le forme non sporigene e se ne comparve qualcuna nell'aria viziata, si trattò di un germe comunissimo nell'aria, nell'acqua, nel suolo a Roma, che tutto fu supporre abbia una resistenza speciale probabilmente anche per organi di vita duratura non scoperti finora, perchè non bene ricercati, il *b. viscosum.*

Tali differenze nei due periodi studiate in relazione al funzionamento nel sistema di ventilazione diventano spiegabilissime: basta infatti considerare che nel periodo estivo si fanno funzionare quasi permanentemente gli spruzzatoi per il raffreddamento, sicchè l'aria come si è veduto, si carica di vapore acqueo. È naturale allora che i germi non si dissecchino e possano sopravvivere anche nella loro fase vegetativa.

Nel periodo invernale invece gli spruzzatoi o non funzionano affatto o per pochissimo tempo, mentre funziona il sistema di riscaldamento; le forme vegetative quindi trasportate dalla corrente di aria asciutta si disseccano e muoiono, così che non sopravvivono che le forme sporigene.

Alcune esperienze fatte in laboratorio per controllare l'esattezza di queste osservazioni parrebbero darmi ragione; infatti avrei trovato che le forme vegetative del *bacterium thyphi*, attaccate a bacchette di vetro poste in un ambiente, in cui l'aria passava con la velocità di cm. 2 al secondo, quando l'umidità relativa dell'aria si manteneva intorno a 30 e l'aria stessa era riscaldata intorno a 26° morirono in un tempo variabile da 3/4 d'ora a 1 ora, mentre quando l'umidità relativa fu portata intorno a 75-80 ancora dopo 2 ore si mantennero vitali e coltivabili.

In tutti i casi anche facendo passare aria completamente secca e priva di acido carbonico, le forme sporigene del bacillo sottile e del bacillo del carbonchio erano vive ancora dopo 48 ore e forse le avrei trovate vive anche dopo un tempo più lungo, se avessi continuato le esperienze.

Cap. IV.

Esame biologico.

È noto che un problema il quale ha interessato e interessa da vicino anche l'igienista, è quello che si riferisce alla tossicità dell'aria espirata, poichè esso si rannoda a quesiti di igiene sanitaria di grande importanza.

Ricorderò che i fenomeni che si avvertono nelle chiese, nei teatri, ecc., vennero dapprima attribuiti al difetto di 0 e all'eccesso di CO_2; ma ambedue questi fatti vennero dimostrati inesatti dal Pettenkofer e da diversi altri osservatori fra i quali va citato l'Hermans che afferma non essere tossica neppure l'aria che contiene il 15 per cento di 0 ed il 2-4 per cento di CO_2.

Si pensò perciò che la supposta tossicità dell'aria fosse dovuta a sostanze organiche e tali sostanze vennero ricercate dal Ransone che raccolse l'acqua di condensazione dell'aria espirata senza riuscire a trovare nel distillato e nel condensato altro che ammoniaca.

Ammisero la presenza di sostanze tossiche che scomparivano quando l'aria espirata si faceva passare sull'ossido di Cu arroventato il Scengen e Nowack, e poi l'Uffelmann, che trovò nell'aria espirata maggior copia di sostanze organiche che in quella ambiente.

Il Brown–Séquard e il d'Arsonval cercarono di precisare la natura di queste sostanze. Anzitutto rilevarono che nell'aria espirata la quantità dell'ammoniaca non è tale da esplicare degli effetti deleteri; che vi si contengono sostanze organiche decomponibili anche a temperature basse e che la tossicità è indipendente dal contenuto in acido carbonico. Essi condensarono i prodotti di espirazione ed iniettarono il condensato nei conigli ottenendo fenomeni generali notevoli. Conclusero quindi col ritenere che nell'aria espirata si conteneva una sostanza tossica forse di natura organica, volatile, solubile nell'acqua e che poteva riferirsi ad un alcaloide, simile alle leucomaine ed alle ptomaine.

Tale sostanza venne poi da loro ulteriormente studiata e affermata essere un veleno organico chimico e non batterico, di natura alcaloidea perchè la reazione del liquido di condensazione era alcalina, perchè perdeva la sua tossicità quando si faceva bollire in un recipiente chiuso, perchè iniettata nei conigli si avevano fenomeni simili a quelli provocati dagli alcaloidi.

Il Wurtz successivamente si occupò della questione studiandola da un punto di vista del tutto chimico. Le osservazioni del Wurtz sono quelle che fino ad ora sono state ritenute dai chimici le più esatte, quantunque dal punto di vista biologico esse non abbiano tanta importanza perchè l'A. non ha fatto alcuno esperimento sugli animali. Il Wurtz cercò le basi che dal sangue passano nell'aria espirata; fece perciò passare questa in soluzione di acido ossalico all'1 per cento, neutralizzò l'eccesso di acido ossalico con carbonato di calcio, aggiunse qualche goccia di acqua di calce fino a reazione debolmente acida, filtrò, neutralizzò il filtrato con HCl ed evaporò nel vuoto, ottenendo cloruro di ammonio in eccesso e il cloruro di una base precipitabile col reattivo di Bouchardat, con ioduro di potassio e mercurio ed un composto cloruro-platinico cristallizzabile, solubile nell'acqua, emanante odore aromatico a 100° C.

Ulteriori studi fatti specialmente dal Merckel dimostrarono che la sostanza tossica dell'aria espirata era un veleno che veniva distrutto dall'H_2SO_4 oppure che con questo contraeva delle combinazioni chimiche.

Interessanti sono queste ricerche del Merkel, fra le quali meritano di essere citate le seguenti:

Egli pose dei topolini in un recipiente ed altri in un altro divisi da un tubo in cui stava l'H_2SO_4. Da uno di questi recipienti faceva l'aspirazione dell'aria espirata notando che morivano prima i topolini che si trovavano nel recipiente che stava innanzi al tubo di H_2SO_4.

Facendo passare dell'aria espirata dall'uomo in una soluzione debole di HCl e facendo iniezioni del residuo ebbe solo fenomeni passeggeri nei topi, e ne concluse che le sostanze tossiche o non erano tossiche nella dose adoperata per le iniezioni o che perdevano la loro tossicità combinandosi con l'HCl: tali sostanze tossiche però non vennero isolate dall'A.

*
* *

La presenza di sostanze tossiche nell'aria espirata venne contestata da vari autori, per es. dall'Hermans, dal Dastre e Loye, dall'Hoffmann e Wallenhof, dal Geyer, ecc.

Alcuni che controllarono gli esperimenti del Brown-Séquard non ottennero i suoi risultati.

Interessanti sono specialmente le ricerche del Lehmann e Jessen i quali studiarono l'aria espirata da uomini normali, facendola passare attraverso una spirale di vetro e raccogliendo il liquido di condensazione. In questo liquido e nel suo distillato, trovarono traccie di ammoniaca e di cloro, piccole quantità di sostanze organiche volatili non determinabili. Nel residuo secco, trovarono il sale calcico di un acido ignoto, forse l'acido silicico proveniente dalle pareti del vetro.

Il Merkel, successivamente condensando molti litri (da 2000 a 4000) di aria espirata, non ottenne negli animali fenomeni degni di nota.

Anche il Beu dapprima sperimentò l'aria espirata condensata, servendosi di grandi quantitá d'aria, circa 3000 litri. In questo liquido trovò ammoniaca ma non cloro, e sostanze organiche, ma nessuna alcaloidea; facendo passare l'aria attraverso HCI ed evaporando il liquido a secchezza, non ebbe alcun risultato con l'inoculazione negli animali, per cui ne dedusse che nell'aria espirata esistono sostanze organiche, ma in quantitá così piccola, da non essere capaci di viziare l'aria espirata più di quello che facciano le altre escrezioni della superficie del corpo.

Il Rauer, il Lübbert ed il Peters ed altri autori ripeterono poi con molta esattezza le esperienze del Brown-Séquard e del D'Arsonval.

In una serie di ricerche, il Rauer dimostrò che gli animali muoiono negli esperimenti del Brown-Séquard, per l'acido carbonico, e anche gli altri autori furono d'accordo col Rauer.

Infine il Ruzicka, chiudendo ermeticamente gli apparecchi, riuscì a dimostrare che anche quando l'aria sia fortemente viziata dalla respirazione, non possiede proprietà tossiche acute.

Finalmente il Formánek (1), siccome Brown-Séquard, D'Arsonval, e poi successivamente Merkel avevano notato che intercalando $H_2 SO_4$ concentrato o una soluzione debole di HCI prima degli ultimi recipienti in cui si trovavano gli animali, questi rimanevano in vita, cercò di definire bene il carattere chimico della sostanza trattenuta in queste soluzioni acide venendo alle seguenti conclusioni:

1. Nei polmoni dell'uomo sano o di altro animale, oltre le note sostanze (CO_2 ed $H_2 O$), non si produce per la respirazione alcuna sostanza tossica che si aggiunga all'aria espirata. Questa può contenere talvolta ammoniaca, che non è prodotto del ricambio materiale, ma deriva dalle decomposizioni che avvengono nella cavità orale, specie se vi sono denti cariati, e in ammalati (per esempio di tubercolosi) anche nella trachea e nei bronchi.

2. Negli esperimenti che provano la tossicità dell'aria espirata, e nei quali questa tossicità vien spiegata per la presenza di una base organica ignota, si lavorò con ammoniaca, che provocò appunto i fenomeni tossici che erroneamente si fecero poi dipendere da una sostanza organica di natura

(1) *U. die Giftigkeit d. Ausathmungsluft.* Arch. f. Hygiene 1900, Vol. 38, p. 1. (In questo lavoro si trovano riassunti tutti quelli degli Autori citati con dovizia di particolari: ed è esso, che ho tenuto presente in questa esposizione).

basica (alcaloide?). Nè vi è bisogno d'invocare un'altra base, oltre l'ammoniaca, poichè tutti gli esperimenti nei quali si volle isolare un'altra base organica dettero esito negativo.

3. Se negli spazi chiusi e mal ventilati anche l'uomo avverte malessere, è preso da delirio, o deliquio ecc., ciò non può spiegarsi con una causa unica. Se così fosse, tutti gli individui trovantisi in quell'ambiente dovrebbero presentare i medesimi fenomeni; ma poichè non è così, si deve ammettere che trattasi di individui più deboli, più sensibili.

Questi fenomeni si affermano allora per via riflessa; per disordini dell'apparecchio termo-regolatore o per nausea suscitata da sostanze di ingrato odore.

Recentemente poi il Sanarelli e il Biffi ripresero la questione studiandola sotto un punto di vista nuovo e con una tecnica assolutamente diversa dalla fin qui seguìta, venendo a questa importante conclusione che: « è sempre più verosimile la supposizione che le sostanze volatili, ancora indeterminate, della esalazione polmonare, siano di origine intestinale e rappresentino svariati prodotti delle fermentazioni intestinali ».

Senza addentrarmi nello studio del meccanismo d'azione dell'aria viziata sull'organismo, ho limitate le ricerche a cercare se nell'aria che veniva richiamata dall'Aula in confronto con quella immessavi sussistessero le condizioni per le quali nell'aria dei luoghi affollati, alcuni autori, hanno creduto di dimostrare un'azione dannosa alla salute. Perciò ho cercato di vedere:

1. *Quanto potevano durare in vita gli animali* (*cavie e conigli*) *nelle gallerie dell'aria sana e dell'aria viziata.*

A tal uopo, ho collocato alcune gabbie nella galleria dell'aria sana e altre in quella dell'aria viziata contenenti gli animali separati gli uni dagli altri. Queste gabbie tenevo sollevate di un metro almeno dal suolo curando la raccolta dei rifiuti sopra vassoi di torba poggiati sul suolo, in modo da impedire, più che fosse possibile, venissero inspirati i prodotti volatili e derivanti da una eventuale putrefazione delle feci, dell'urina, delle sostanze alimentari curando che non ne rimanessero deposti nel fondo delle gabbie, che perciò erano fornite di una rete a maglie larghe.

D'altro canto in laboratorio ho tenuto altri animali entro gabbie analoghe, ma senza scostare il fondo della gabbia dal vassoio e ponendo in questo un piccolissimo strato di torba. Siccome poi, gli animali tenuti nelle gallerie rimanevano per molto tempo all'oscuro, così quelli di controllo in laboratorio, tenni in una camera oscura, che illuminavo a luce elettrica solo per poche ore al giorno.

Man mano che gli animali morivano, procedeva poi all'esame microscopico della milza, del sangue del cuore, e a culture degli stessi organi.

Trovai così che:

a) le cavie ed i conigli morivano in breve tempo tanto se tenuti nella galleria dell'aria sana, quanto se tenuti in quella dell'aria viziata: cioè, in poco più di 3 giorni nel periodo estivo, in 6-7-8 nel periodo invernale: per converso gli altri animali (controlli)

tenuti all'oscuro in laboratorio, in ambiente non ventilato, vissero un tempo incomparabilmente più lungo (20 e più giorni),

b) degli animali trovati morti nella galleria dell'aria viziata venne dal sangue isolato il *pneumobacillo di Friedländer* più volte e qualche volta il *diplococco di Fränkel*, molte volte il *b. coli;* da quelli tenuti nella galleria dell'aria sana venne isolato sempre il *b. coli*, da quelli tenuti in laboratorio lo stesso germe, ma non in tutti i casi, perchè riuscirono sterili le ricerche dal sangue del cuore in vari di essi e ciò allorchè si potè procedere all'autopsia immediatamente dopo la morte, cosa che non si potè mai fare per gli animali che morivano nelle gallerie.

2) *Se nell'acqua di lavaggio dell'aria sana e viziata si trovassero sostanze tossiche per le cavie e i conigli.*

All'uopo feci gorgogliare aria sana ed aria viziata in acqua distillata sterilizzata sia senza alcuna precauzione preliminare, sia costringerla a passare a traverso a una candela porosa attaccata per mezzo di un tubo di gomma ad una bottiglia a gorgogliamento. L'acqua in cui si era venuta a lavare l'aria inoculai poi in cavie e conigli.

Non espongo i risultati di questa duplice serie di ricerche in un quadro perchè lo credo superfluo. Dirò solo che gli animali a cui si inoculò l'acqua di lavaggio dell'aria non filtrata attraverso caolino, morirono, buona parte per infezione da *pneumobacillo di Friedländer*, qualcuno per infezione da *b. pseudoedema*; e gli altri sopravvissero.

In quelli in cui si inoculò l'acqua di lavaggio filtrata, non si notò nessun fatto degno di nota diportandosi essi, su per giù, come i controlli non inoculati.

***

Ora è lecito dedurre da questi esperimenti che se gli animali trovavano condizioni inadatte alla loro vita, tanto nella galleria dell'aria viziata quanto in quella dell'aria sana, la loro morte doveva essere indipendente dalla presenza nell'aria delle supposte sostanze tossiche degli autori.

Non basta infatti a spiegare la morte cui andarono incontro, l'essersi trovati nell'aria dei germi capaci di uccidere gli animali penetrando in essi per la via respiratoria, perchè l'acqua di lavaggio dell'aria solo eccezionalmente mostrò contare tali batteri; anzi, in molti non si trovò che il *b. coli*, che certamente era entrato in circolo *post mortem*, dacchè gli animali non potevano venire sottoposti all'autopsia, il più delle volte, se non dopo molte ore dalla morte.

Nè infine si può ammettere la presenza di altri materiali tossici solubili, perchè l'acqua di lavaggio inoculata in cavie e conigli non ha mai prodotto alcun fatto degno di nota negli animali.

Quindi per spiegare perchè tutti gli animali morissero nelle gallerie, presi in considerazione i seguenti fattori fisici:

1) Gli sbalzi rapidi di temperatura a cui andavano dal giorno alla notte, soggetti gli animali lasciati nel sotterraneo permanentemente;

2) L'umidità dell'aria che in estate per difetto dell'apparecchio di disidratamento veniva mantenuta per tutta la durata delle sedute ad un grado elevato;

3) La velocità della corrente che nel sito in cui erano esposte era di m. 1. 50 al 1", oltre all'oscurità, e alle condizioni locali, perchè si trattava sempre di sotterranei per quanto ben fatti.

Ho quindi nel 1902 istituito in laboratorio alcune esperienze per verificare l'influenza di questi fattori sulla vitalità delle cavie ed ho trovato che le cavie tenute per 3-4 ore del giorno alla temperatura di 18-20° in luogo con U. R di 35-40 e poi dopo portate rapidamente alla temperatura di 28-30° per 8-10 ore, sopportano tali sbalzi, anche se negli intervalli vengono tenute all'oscuro: in genere dopo il 12° giorno qualcuna ne muore, ma mai si ha una morìa così generale come nelle gallerie. Portando però il grado di U. R. a 85-90-93 in genere, dopo 8 giorni, sono poche le cavie che rimangono vive: se poi si insuffla continuamente aria nell'ambiente in modo da determinare correnti della velocità di 2 metri al 1" sono più quelle che muoiono di quelle che sopravvivono al 4° giorno dall'inizio dell'esperimento.

È evidente dunque che fattori fisici avevano la più grande importanza nel diminuire la resistenza organica degli animali nelle gallerie dell'aria sana e dell'aria viziata ciò che corrisponde al concetto popolare che i rapidi sbalzi di temperatura, l'umidità e le correnti siano le tre cause di tutti i malanni.

E poichè l'umidità relativa era più elevata nella galleria dell'aria sana, che in quella dell'aria viziata, così si spiega perchè in estate morissero più rapidamente le cavie poste nella galleria dell'aria sana che in quelle dell'aria viziata, ciò che a prima vista pareva un assurdo.

***

Attesi questi risultati, bisognava ora vedere se nell'aula si mantenessero tali condizioni di predisposizione.

È però subito facile comprendere che detti fattori fisici predisponenti vi mancano del tutto: infatti sono evitati gli sbalzi di tempera-

tura, perchè durante la seduta si mantiene pressochè nello stesso grado; non vi sono correnti paragonabili non solo a quelle delle gallerie d'immissione e di richiamo, ma vi mancano affatto: rimane soltanto elevato il grado di umidità nell'estate, per la mancanza dell'apparecchio di disidramento, inconveniente a cui si può trovare rimedio quando si voglia.

Del resto, a questi fattori fisici predisponenti fino ad un certo punto si può dare valore anche nelle gallerie, se vi si rimane soltanto per tutto il tempo che durano le sedute.

Tanto io quanto il dottor Baiardi infatti non abbiamo risentito alcun danno della nostra permanenza nelle gallerie, e notisi che durante tutto il tempo che vi rimanevamo ci assoggettavamo a un strapazzo fisico non piccolo per mettere e mantenere in funzione degli aspiratori di 20-25 litri di cui ne avevamo 14 paia che bisognava volta a volta alzare di peso ed abbassare e ciò almeno 4 volte per ogni esperienza e in luoghi separati e lontani (1).

D'altro canto ebbi a notare che quando in primo tempo disposi delle gabbie con conigli nella camera di calma sotto l'Aula dove la corrente si fa sempre pochissimo sentire e anche l'umidità relativa d'estate è già diminuita di qualche grado, gli animali duravano in vita anche 10-13 giorni e uno persino 15, ciò che dimostra che quivi le condizioni di predisposizione erano già diverse da quelle che si trovavano nelle gallerie.

***

Rimaneva ora da vedere perchè nella galleria dell'aria viziata non si trovassero condizioni predisponenti maggiori che in quella dell'aria sana, poichè è ben vero che nella prima non si trovò alcuno di quei gas che esperimenti scientifici rigorosi come quelli del Di Mattei, hanno dimostrato che sono degli agenti predisponenti, ma ciò non toglie che si sentisse spesso e molto bene quel tanfo speciale proprio dei luoghi chiusi che a me fa provare un senso di molestia repentino e involontario nei luoghi affollati e non ventilati.

Ma, come risulta dall'esame chimico, il ricambio dell'aria nell'aula e la mescolanza dell'aria pura alla viziata è tale che anche nell'aria viziata delle sedute più numerose, non si trovano le condizioni dell'aria dei luoghi confinati neppure riguardo all'O e al CO^2.

(1) Basti dire che per giungere dalla sede dell'impianto degli apparecchi per lo studio dell'aria sana a quello per lo studio dell'aria viziata occorreva andare e venire continuamente percorrendo tutta la galleria semicircolare.

Ecco perchè le condizioni di predisposizione nella galleria dell'aria viziata si mantennero pressochè uguali a quelle dell'aria sana.

Concludendo, bisogna ammettere che gli animali posti nelle gallerie, eccezione fatta di quelli morti d'infezione, perissero per cause fisiche e che se anche l'aria ivi richiamata conteneva delle sostanze tossiche, queste si trovavano in proporzioni così piccole e forse tanto diluite dall'aria sana immessa nell'aula da non cagionare alcun danno apprezzabile alla salute, e ciò dimostra che nell'aula le condizioni dell'ambiente si potevano considerare perfette.

Conclusioni.

Le conclusioni che si possono ricavare dal presente studio sono le seguenti:

1) Il modo di comportarsi della temperatura dell'aria sana e dell'aria viziata dimostra che l'aria viene immessa nell'Aula, l'estate sufficientemente raffreddata e l'inverno ad una temperatura costante nè troppo bassa nè troppo elevata.

2) Il modo di comportarsi dello stato igrometrico dell'aria dimostra che nel periodo estivo il grado di umidità relativa che possiede l'aria che viene immessa nell'Aula è troppo elevato.

3) Il modo di comportarsi della quantità dell'acido carbonico nell'aria viziata e di quella dell'ossigeno, dimostra che l'aria nell'Aula non trovasi mai nella condizione di quella dei luoghi affollati e non ventilati: mancando in essa anche tracce di gas corruttori appare evidente l'ottima situazione del camino di presa.

4) Il numero dei germi per mc. d'aria immessi nell'Aula subisce delle oscillazioni che non si possono mettere in relazione col funzionamento del sistema di ventilazione, tenendo chiusa naturalmente qualunque comunicazione col sotterraneo.

5) Le specie batteriche trovate nell'aria nel periodo invernale, scarsissime di fronte a quelle trovate nel periodo estivo e tutte sporigene, dimostrano che un certo grado di asciuttezza dell'aria dovuto al riscaldamento permette sopravvivano solo i batteri sporigeni, ai quali, nel periodo estivo, si aggiungano anche dei non sporigeni che trovano nell'umidità elevata dell'aria che viene immessa, condizioni adatte di vita.

6) L'assenza nell'aria che si aspira dall'Aula di quelle sostanze le quali determinano dei fenomeni tossici, negli animali, dimostra

che mancano in essa le condizioni per le quali nei luoghi affollati gli individui vanno soggetti a malesseri, sia pure passeggeri.

7) Nelle gallerie dell'aria sana e viziata agiscono dei fattori predisponenti fisici che determinano la morte degli animali (sbalzi di temperatura dal giorno alla notte, correnti d'aria, umidità) i quali nell'Aula sono eliminati: rimane solo l'aria troppo umida in estate.

8) I dati quindi posti nel programma di concorso si sono trovati giusti ed esatti nella pratica, e il modo come il progettista ha risoluto i vari problemi che gli si presentavano, sia dal punto di vista fisico che da quello economico, appare perfettamente riuscito ed in tutto commendevole.

Corollari pratici.

Tenendo presente il funzionamento del sistema studiato e i risultati degli esami fatti, ne emergono i seguenti corollari pratici:

1° *Il funzionamento del sistema di ventilazione* non lascia nulla a desiderare quando è ben regolato, perchè allora l'aria dell'Aula non subisce alcuno dei viziamenti dell'aria dei luoghi confinati;

2° *il funzionamento del sistema di riscaldamento* non lascia adito ad alcuna censura: le oscillazioni nella curva della temperatura, in parte dipendenti da cause che non hanno relazione col funzionamento stesso, in parte da quest'ultimo, sono tutte disciplinabili;

3° *il funzionamento del sistema di refrigeramento*, il quale si raccomanda per la sua straordinaria semplicità ed economia, funziona bene tutte le volte che si tratta di abbassare di vari gradi la temperatura dell'aria esterna.

4° *il sistema di disidratamento* dell'aria non esistendo, le mie ricerche dimostrano che sarebbe necessario impiantarlo, completando così il progetto come fu ideato.

5° il funzionamento poi di tutto il sistema, considerato dal punto di vista igienico, viene ad essere censurabile tutte le volte che si apre la porta di comunicazione del sotterraneo con la camera dei ventilatori di presa che si trova ad avere finestre a livello della piazza di Montecitorio. Del resto non si comprende come avendo una così perfetta presa a 52 metri dal suolo, si voglia mescolare l'aria richiamata da tale altezza, con quella presa proprio radente al suolo e da sotterranei!

Laboratorio di patologia generale della R. Università di Roma

Isoagglutinine ed isolisine del siero umano

(La milza ed alcuni poteri specifici del siero)

per il dottor **ACHILLE CAPOGROSSI.**

In pochi anni lo studio delle proprietà biologiche del siero del sangue ha assunto tali proporzioni, che non sarà inutile esporre brevemente, per la maggiore chiarezza dell'argomento svolto nel presente lavoro, le principali idee che oggi dominano nel campo scientifico intorno a questo tèma (1).

Oltre al fermento saccarificante (già da tempo conosciuto), sono state scoperte nel siero varie specie di attività biologiche naturali od acquisibili. fra cui le principali sono:

1. *Potere antifermentativo.* — Iniettando in un animale un fermento capace di produrre in vitro la scissione di alcune sostanze chimiche complesse, si può ottenere un siero, in presenza del quale, il detto fermento diventa inattivo (2).

2. *Potere precipitante* o *coagulante* (3). — Un animale *A*, trattato con iniezioni di siero di un altro animale *B*, può dare un siero che produce un precipitato in quello dell'animale *B*.

Rispettivamente un animale, trattato con iniezioni di una brodo-cultura batterica, può dare un siero che produce un precipitato nella brodo-cultura *filtrata* del germe adoperato nel trattamento. Di fronte a questa proprietà sta quella *anticoagulante* che è una varietà del potere antifermentativo, e che presenta (se non in maniera assoluta) i caratteri della specificità (4).

3. *Potere antitossico.* — Un siero può possedere o acquistare, con uno speciale trattamento, proprietà antitossiche, ossia neutralizzanti la tossina di un dato microrganismo.

4. *Potere citolitico* o *citotossico.* — È la proprietà che il siero può avere di dissolvere certi elementi cellulari. Questa proprietà, dovuta ad uno speciale fermento, da alcuni detto *citasi,* è suscettibile, con speciali trattamenti

(vaccinazione), di essere esaltata verso date specie di elementi cellulari. Ma la citasi non agisce da sè sola sull'elemento che deve essere distrutto. Essa è coadiuvata nella sua azione da un altro corpo, che pure o esiste normalmente, o si produce nell'organismo pel trattamento a cui questo è stato sottoposto. Questo corpo è stato dagli autori variamente chiamato: *sensibilizzatrice*, *anticorpo*, *zwischenkörper*, *ricettore di 3° ordine*, *desmone*, ecc. Vedremo in seguito il suo modo di agire. Intanto enuncierò due delle varietà principali del potere citolitico: 1. *Potere batteriolitico* (dissoluzione dei bacteri); 2. *Potere emolitico* (dissoluzione dei globuli rossi). Il potere emolitico del siero verso i globuli rossi di animali della *stessa* specie viene comunemente detto *isolitico*, ed *isolisina* la sostanza che lo determina, da distinguersi dalla *eterolisina*, che agisce sugli eritrociti di individui di un'altra specie.

5. *Potere agglutinante.* — Anche questo può esercitarsi su vari elementi, fra cui i globuli rossi ed i bacteri, che vengono agglomerati in ammassi informi. Secondo molti autori, questo potere è ben distinto dal potere emolitico e batteriolitico. Si potrebbe avere cioè la agglutinazione dei globuli rossi o dei bacteri, senza che ne avvenga la dissoluzione, e viceversa.

Analogamente alle lisine, anche le sostanze del siero capaci di agglutinare i globuli rossi (*emoagglutinine*) si distinguono in *isoagglatinine* ed in *eteroagglutinine*, secondo che la loro azione si spiega sui globuli rossi di animali della stessa specie o di specie diversa.

Qualcuna di queste speciali attività del siero si può riscontrare in esso naturalmente, altre o non vi sono, o sono talmente deboli, che non si manifestano ordinariamente, ma si sviluppano quando l'animale venga sottoposto ad apposita vaccinazione con quella data sostanza contro la quale il siero deve diventare attivo. Si può comprendere l'essenza di questi fenomeni nella legge enunciata da Behring (5):

« Iniettando ad un animale elementi dotati di certe attivitá di ordine biologico, si stimola nell'animale la produzione di sostanze nuove, specifiche, capaci di inibire le attività di questi elementi. »

Più gli studi procedono, e più il concetto della specificità sembra che tenda ad essere rigoroso. Non solamente il siero può divenire attivo di fronte a svariati elementi morfologici impiegati nel trattamento, ma può anche acquistare speciali e molto sensibili proprietà precipitanti verso le più svariate soluzioni di albuminoidi iniettate.

Così numerosissimi lavori sono venuti a dimostrare che animali acconciamente preparati possono fornire un siero che permetta di differenziare fra loro varie specie di albumine, come hanno veduto Bordet (l. c. 1899), Wassermann (6), Schütze (7) Uhlenhuth (8) ed altri; oppure possa servire al riconoscimento delle macchie di sangue a scopo medico-legale, come ha proposto pel primo Deutsch (9), ed in seguito hanno dimostrato le nuove ricerche di Uhlenhuth (10), Wassermann e Schütze (11), Ziemke (12) e moltissimi altri.

In tal modo si comprende come i risultati di alcune esperienze possano esser molto complessi.

Iniettando ad un animale sangue di un altro di specie diversa, possono svilupparsi nel siero del primo varie attività specifiche, perchè vari sono gli elementi iniettati (siero, corpuscoli, ecc.), e rispettivamente iniettando

una cultura batterica, la specificità può ottenersi verso i batteri e verso i prodotti della loro attività biologica.

Nell'insieme di questi fenomeni sta il segreto dell'immunità naturale ed acquisita. Ma il modo con cui l'organismo reagisce verso la presenza di sostanze eterogenee non può essere sempre interpretato in senso teleologico, ossia con lo scopo dell'autodifesa (13). A seconda del trattamento, esso produce indifferentemente sostanze deleterie tanto per gli agenti nocivi (bacteri), quanto per elementi innocui come i globuli rossi.

Per spiegare il meccanismo di produzione dei poteri specifici del siero vi sono varie teorie. Buchner (14) ammetteva che l'immunità naturale e la immunità acquisita dovessero essere completamente separate: la prima dipenderebbe dalle *alessine*, la seconda dalle *antitossine*.

Le alessine sarebbero prodotti solubili, instabili, forniti in special modo dai leucociti, e dotati di potere bactericida e globulicida. Esse agirebbero ancora diminuendo la ricettività dei tessuti organici alle tossine. Più recentemente l'istesso autore ammise (15) anche l'esistenza degli *anticorpi* (vedi sopra), resistenti a 60° C.

Metchnikoff (l. c.), adattando la sua teoria fagocitaria alle nuove scoperte, ammette che l'azione citolitica dei sieri sia l'effetto di uno speciale fermento, che sarebbe appunto la *citasi* di cui sopra abbiamo parlato. La citasi è, secondo l'A., un prodotto cellulare dei fagociti (macrociti e microciti). Si distingue una *macrocitasi* ed una *microcitasi*. I *fissatori*, o sostanze atte a favorire l'azione della citasi (anticorpi), sarebbero anche esse un prodotto dell'attività cellulare dei microciti.

Ehrlich (16), in una serie di lavori, ha emesso una teoria favorevolmente accolta, che ha il vantaggio di potersi adattare alla spiegazione della origine di molte proprietà specifiche dei sieri. In base a molte osservazioni egli ha ammesso che un veleno agisca come tale in quanto possa combinarsi col protoplasma di determinati distretti cellulari. Le tossine si comporterebbero in tal modo; esse cioè si combinerebbero con alcuni elementi dell'organismo, simili in ciò anche alle sostanze albuminoidi nutritive alle quali sono chimicamente molto vicine. Il protoplasma possiede per queste combinazioni gruppi molecolari speciali o bracci di presa (*Fangarm*) o *catene laterali* (*Seitenketten*). L'esistenza di questi gruppi combinabili con la tossina, costituisce per l'elemento cellulare la condizione di suscettibilità alla azione della tossina stessa.

Quando la tossina ha tolto al gruppo molecolare una o più catene laterali combinandosi ad esse, viene ad essere neutralizzata, ma residua da ciò un difetto funzionale della cellula. Nello stesso tempo, per il fatto della sovracompensazione della perdita degli elementi viventi (Weigert), si verifica nell'elemento cellulare una produzione in eccesso di altre *catene laterali*, che, facendosi libere in circolo, possono combinarsi ad altre molecole di tossina circolanti, e costituire così vere molecole di *antitossina*. Ciò che si dice per la tossina può valere anche per un altro corpo albuminoide. La catena laterale che entra in combinazione con questi corpi albuminoidi viene anche detta *ricettore*. L'aggruppamento atomico della tossina o del corpo albuminoide, che permette la combinazione, viene detto anche *gruppo aptoforo*.

Ricerche dell'istesso autore fatte insieme con Morgenroth (1) e confermate subito da altri (17) rendono verosimile che, oltre questi semplici *ricet-*

tori di 1° ordine (antitossine), i quali hanno la proprietà di combinarsi con sostanze relativamente semplici (tossine, fermenti, ed altri prodotti cellulari), ve ne siano altri più complessi, i quali entrano in azione quando si tratta di sostanze albuminose di alta struttura molecolare come si trovano nelle cellule viventi.

Ehrlich (18) si riporta nello studio di questi fatti al probabile comportamento delle cellule di fronte alle sostanze alimentari, ma le sue conclusioni si possono riferire anche ad altre sostanze estranee introdotte, per esempio i globuli rossi, gli spermatozoi, ecc. Nel caso delle sostanze alimentari dunque, la condizione necessaria per la nutrizione della cellula è la fissazione della molecola. Ma tale molecola gigantesca non sarebbe utilizzabile se non per mezzo di processi fermentativi. Questo scopo sarebbe raggiunto se il braccio di presa o catena laterale o ricettore possedesse, accanto al gruppo che entra in combinazione con la molecola, anche un gruppo fermentativo. Tale ricettore capace di fissare la molecola, e di portarla in intimo contatto con il fermento che deve digerirla, è detto *ricettore di 2° ordine.*

Ma, in base a fatti numerosi, si deve anche, secondo Ehrlich, ammettere che le cellule posseggano anche *ricettori di 3° ordine* o *amboccettori*, provvisti di due gruppi aptofori, dei quali l'uno trattiene la sostanza alimentare o dissolvibile (p. es. il globulo rosso), l'altro tira a sè certe sostanze, circolanti nel plasma, dotate di azione simile alla fermentativa (*alessina* di Buchner, *citasi* di Metchnikoff).

Soltanto per mezzo della combinazione con tali sostanze, che, appunto per la loro funzione complementare, Ehrlich ha chiamato *complementi*, il ricettore di 3° ordine (*sensibilizzatrice* di Bordet, *anticorpo*) acquista la capacità di compiere un lavoro fermentativo. Nel sangue si troverebbero, secondo Ehrlich, vari tipi di complementi costituiti in modo simile alle tossine, aventi cioè un gruppo aptoforo che si combina col gruppo complementofilo del ricettore, ed un gruppo attivo, che agisce nel senso di un fermento.

Questa dottrina ammette dunque ricettori di 1° ordine, per esempio le antitossine; ricettori di 2° ordine per, esempio le agglutinine; ricettori di di 3° ordine per esempio le citolisine.

Riguardo a queste, quasi contemporaneamente Bordet era tratto dai suoi importanti studi (19) a conclusioni analoghe. Solamente egli, come in generale tutta la scuola francese, chiama il ricettore di 3° ordine (o anticorpo), *sensibilizzatrice*, ed il complemento *alessina*, conservando la classica denominazione di Buchner.

Non crede inoltre necessario ammettere (20), per spiegare l'emolisi, che la sensibilizzatrice si combini con l'alessina, e ritiene perciò che il nome di *ambocettore* non sia appropriato.

Dubita pure che le alessine in uno stesso siero siano molteplici, mentre dalle proprie ricerche sarebbe indotto a ritenere che una stessa alessina possa attaccare elementi diversi.

Non combatte per altro l'opinione di Ehrlich e Morgenroth (l. c.) che i sieri nuovi possano contenere, oltre l'alessina, una o forse più sensibilizzatrici. Comunque, non ostante questo diverso modo di vedere, anche ammesso col Metchnikoff che i leucociti siano i generatori di questi mezzi di

difesa, il concetto fondamentale resta. Nei sieri citolitici, ottenuti con un trattamento speciale, e talora anche nei sieri nuovi, esistono due sostanze, delle quali una si combina con l'elemento che deve essere distrutto, e permette in tal modo che su di esso si eserciti l'azione dissolvente dell'altra.

***

E nostro scopo occuparci delle isoagglutinine e delle isolisine del sangue umano.

Lo studio di tali sostanze dal punto di vista biologico è possibile tenendo conto non solo delle ricerche fatte sull'uomo, ma anche di quelle più complete sul potere emolitico ed emoagglutinante del siero degli animali. I lavori comparsi nel corso dell'ultimo quadriennio intorno a questo argomento sono molto numerosi, e i risultati diversi, e talora in contraddizione gli uni cogli altri. Inoltre, siccome vi è tendenza a riunire in una stessa classe di fenomeni l'agglutinamento delle emazie e dei bacteri, anche la numerosa serie di osservazioni sulla agglutinazione di questi ultimi, e le varie teorie a cui ha dato luogo l'interpretazione del fenomeno, cooperano a rendere più vasto il campo della letteratura. Mi sono provato tuttavia a raccogliere e riferire cronologicamente i risultati dei lavori che dànno una spiegazione generica dei fenomeni di agglutinazione e di emolisi, o che indirettamente contribuiscono a questo scopo, fermandomi su quelli che contengono ricerche fatte sull'uomo.

Era già noto da molto tempo che i corpuscoli rossi si disciolgono facilmente in un siero di sangue eterogeneo, e che, prima di dissolversi (2), tendono a riunirsi aderendo tenacemente fra loro. Bordet (22) indicò nettamente l'azione agglomerante ed immobilizzante dei sieri degli animali vaccinati contro i vibrioni, su tali microrganismi. Vide che tale potere del siero non si distruggeva a 55°, o per la diluizione con una soluzione salina. In un successivo lavoro (23) descrisse il fenomeno dell'agglutinazione dei globuli rossi della cavia, sospesi nel proprio siero, per l'aggiunta di una piccola quantità di siero di coniglio. Quasi simultaneamente, per opera di Gruber e Durham (24) e di Vidal (25), si potè trarre profitto dell'agglutinazione dei bacilli tifosi come mezzo di diagnosi. Gruber (l. c.) emise la teoria che l'agglutinina renda più viscosa la membrana dei microorganismi. Analogamente a Bordet (23), Vidal e Sicard (26) dimostrarono che i bacilli del tifo, uccisi col calore o con un antisettico sono ancora agglutinabili. Hayem (27) vide che il potere agglutinante del siero dei tifosi resiste a 57°-59° C. Kraus (l. c.) ritenne che per l'agglutinazione non necesitasse la presenza dei corpi microbici, perchè il fenomeno può ottenersi in modo specifico per l'azione di un siero attivo sulle culture filtrate di certi microrganismi (produzione di precipitato). Paltauf (28) ammise che i microbi si agglutinassero perchè tra-

scinati fra le maglie di un coagulo formatosi nel liquido ambiente. Malvoz (29) trovò che vi sono delle sostanze chimiche che agglutinano il bacillo del tifo. Salvioli (30) ha dimostrato come vi siano degli animali (cane, bue) il cui siero agglutina in ammassi i granuli fini sospesi in un liquido, come ad esempio quelli dell'inchiostro della Cina o quelli di carminio. Secondo Nicolle (31) il corpo di certi microbi contiene una sostanza particolare, *agglutinabile*, che sta negli strati esterni di esso. L'agglutinazione consisterebbe nella coagulazione e coalescenza degli strati esterni sotto l'influenza di un dato siero. Secondo Dineur (32) invece le ciglia avrebbero la più grande importanza nell'agglutinazione dei microbi. Intanto Belfanti e Carbone (33) avevano scoperto l'azione tossica del siero di animali inoculati ripetutamente con sangue di un altro animale, verso quest'ultimo. Queste importanti ricerche preannunziarono quelle notevoli di Bordet e quelle su citate di Ehrlich e Morgenroth. Bordet (34), infatti avendo veduto che mentre la sostanza emolitica di un siero per certi dati globuli si distrugge a 55° (come aveva dimostrato Buchner (35), e la sostanza agglutinante resiste a questa temperatura anche per mezz'ora, fu colpito dalla somiglianza del contegno di questi sieri con quello dei sieri degli animali vaccinati con i vibrioni colerici, verso i vibrioni stessi. Pensò allora di vaccinare un animale col sangue di un altro, e vedere se aumentava l'azione emolitica e agglutinante del siero del primo animale verso gli eritrociti del secondo. La prova riuscì. Egli ammise che i sieri possano essere, anche normalmente, globulicidi ed emoagglutinanti.

La sostanza globulicida si distrugge a 55°. Quella agglutinante resiste molto di più.

Bossaert (36) analogamente a Malvoz (l. c.) trovò che si può provocare l'agglutinazione di bacilli del colera o simili, anche con sostanze chimiche semplici. Secondo Emmerich e Löw (37) l'agglutinazione dei microbi non è che il primo stadio dell'effetto batteriolitico di enzimi che si formano nelle culture.

Questo modo di vedere è in contrasto con i risultati di molti altri e specialmente di Bordet e di P. T. Müller (38). Bordet (39) si è occupato in seguito del meccanismo della agglutinazione. Egli riunisce evidentemente in una stessa serie di fenomeni l'agglutinazione dei bacteri, dei globuli rossi e delle particelle inorganiche. Combatte efficacemente le precedenti teorie sulla agglutinazione. Crede che le agglutinine, fissandosi sugli elementi agglutinabili, apportino delle modificazioni nelle forze di attrazione molecolare che si verificano fra essi e il liquido ambiente. L'effetto che ne deriva, cioè la formazione di ammassi, fa parte di una serie di fenomeni che possono secondo il concetto di Duclaux (l. c.) appartenere ad uno stesso genere: fenomeni di coagulazione. In un lavoro successivo (40) egli distinse nettamente fra loro la proprietà emolitica (sensibilizzante), agglutinante e precipitante dei sieri degli animali trattati. Il lavaggio con soluzione fisiologica non toglie ai globuli la suscettibilità di essere agglutinati e disciolti. Secondo Levaditi (41) i sali solubili di calce sono indispensabili alla produzione dell'agglutinazione. Sabrazès e Brengues (42) trovarono che varie sostanze chimiche agglutinano il bacillo del tifo. Landsteiner (43), al quale non erano note le ricerche del Salvioli (102), confermò l'azione agglutinante delle globuline separate dal siero del sangue. Ha veduto che il siero umano

può agglutinare i globuli di altri individui, specialmente quando proviene da malati gravi. Maragliano (44) aveva già da tempo osservato il potere globulicida che può avere il siero umano ed il suo straordinario accrescimento in condizioni patologiche. Questo potere sarebbe, secondo l'A., connesso con la povertà del siero in cloruro di sodio e si correggerebbe aggiungendo al siero medesimo il cloruro sodico deficiente. Non si tratterebbe però di un semplice fatto di plasmolisi, piuttosto di un'azione del NaCl sulla vitalità delle emazie e degli albuminoidi del siero.

Malkoff (45) dimostrò che il siero normale di alcuni animali può contenere parecchie agglutinine, ciascuna delle quali è specifica di fronte ad una determinata specie di eritrociti. Nolf (46), in base alle proprie ricerche sostenne che, negli animali preparati, le precipitine del siero sarebbero dovute solamente all'iniezione del siero (globuline), l'agglutinina sarebbe prodotta dalla parete globulare, il contenuto cellulare produrrebbe invece l'anticorpo. Bordet (47) in un nuovo lavoro tendeva ad ammettere l'unicità dell'alessina dei sieri. Grünbaum (48) pensò pel primo di usufruire della agglutinazione dei corpuscoli rossi (che Landsteiner aveva osservato col siero di uomini malati) per ricerche diagnostiche. Shattock (49) emise l'idea che il normale aggruppamento a pile dei globuli rossi sia un fenomeno di agglutinazione. Egli notò in alcune malattie acute dell'uomo l'aumento del potere isoagglutinante del siero. Ehrlich e Morgenroth (50) erano intanto riusciti ad ottenere sperimentalmente isoagglutinine ed isolisine da animali trattati con iniezioni di sangue di altri individui della stessa specie. Donath (51) osservò il potere isoagglutinante del siero umano in diversi stati morbosi, specialmente anemici, e talora anche nei sani. Halban (52) trovò isoagglutinine nel sangue materno e spesso non in quello fetale. Neisser (53) confermò la moltiplicità degli anticorpi e delle normali agglutinine del siero. Lo Monaco e Panichi (54) proposero di valersi del potere isoagglutinante del siero per la diagnosi di malaria.

Friedberger (55) vide che le sostanze agglutinanti possono passare nelle urine. Joos (56) ha sostenuto in più di una pubblicazione che il cloruro di sodio (od un altro sale) entra nella combinazione chimica della sostanza agglutinante e della agglutinabile, ed è la causa immediata dell'agglutinazione. Köhler (57) giunse a ritenere che nell'agglutinazione dei bacilli del tifo si tratti di un fenomeno chimico che può essere indipendente dalla immunità o dalla infezione specifica, dovuto alla precipitazione di alcune sostanze dalle quali i bacteri sono trascinati e inglobati. Anche il siero di individui non tifosi può agglutinare i bacilli del tifo. Ascoli M. (58) constatò il potere isoagglutinante del siero di uomini sani e malati, e la varia sensibilità degli eritrociti umani alle isoagglutinine ed alle isolisine. Camus e Pagniez (59) non constatarono isoagglutinine nei sani, ma in parecchi malati. Gabbi e Nadalà (60) osservarono in vitro il potere emolitico del siero in sei casi di anchilostomiasi.

Schütze e Scheller (61) dimostrarono che il complemento emolitico normalmente esistente nel sangue di un animale può essere consumato *in vivo* iniettando quella data quantità di globuli eterogenei che il siero può disciogliere.

Bongiovanni (62) affermò che il potere emolitico ed emoagglutinante di un siero, osservato *in vitro* ed *in vivo* presenta sempre differenze molto spic-

cate. Grixoni (63) confermò i risultati di Lo Monaco e Panichi. In successive indagini riscontrò potere isoagglutinante anche in tifosi e tubercolosi gravi. Neisser e Döring (64) poterono stabilire che l'emolisina umana (per i globuli rossi di coniglio) possiede la stessa costituzione della lisina studiata da Ehrlich e Morgenroth nei sieri normali od immunizzanti di certi animali. Infatti il riscaldamento a 56° distruggerebbe anche qui senza eccezione il complemento. Conclusero anche per l'esistenza almeno di due complementi e di due anticorpi nel siero umano.

Mircoli (65) nella clinica del Maragliano dimostrò che il potere emolitico dei tubercolotici varia secondo il decorso e gli esiti della malattia. L'indice emolitico sarebbe più debole nei casi che hanno poca tendenza alla guarigione. Mertens (66) giunse alla conclusione che in un siero la sostanza immunizzante è diversa dalla agglutinante. Nel frattempo io comunicai (67) i risultati di alcune ricerche che mi permettevano di concludere non essere il fenomeno dell'isoagglutinazione specifico per la malaria. Ascoli M. (68) in nuove indagini riscontrò debole potere isolitico in sieri umani normali e forte potere isoagglutinante e isolitico in alcuni stati morbosi. Novi e Meruzzi (69) osservarono che il sangue di individui malati e affaticati o digiunanti agglutina il sangue normale. Ascoli M. e Riva (70) iniettando a conigli leucociti lavati di cane, ottennero nel siero di questi animali una sostanza capace di neutralizzare il complemento del siero di cane (anticomplemento) che interviene nella lisi prodotta da questo in globuli rossi di conigli. Quindi probabilmente, secondo gli autori, i leucociti partecipano alla produzione dei complementi.

Secondo Harrison (71) la sostanza agglutinabile dei bacteri sta solamente nei loro strati esterni. Castellani (72) potè concludere dalle sue ricerche che fra le sostanze agglutinanti e gli anticorpi esistono i più stretti rapporti. Pace (73) confermò il potere isoagglutinante del siero umano normale e patologico, ma non quello isolitico. Eisenberg (74) ancora constatò il potere isoagglutinante del siero di individui affetti da varie malattie o di sani, e vide che i sieri agglutinanti acquistavano potere emolitico (complemento) per l'aggiunta di siero di coniglio raccolto da 3 a 5 giorni. Ed anche Landsteiner (75) concluse che il siero di individui adulti sani può contenere più isoagglutinine. In un altro lavoro egli potè ottenere la sostanza agglutinante da eritrociti agglutinati. Asakawa (76) ammise che la sostanza agglutinante non si possa scindere dalla globulina.

Resinelli (77) vide che il sangue del feto contiene per lo più emolisine ed emoagglutinine in quantità minore di quello della madre. Altobelli e Memmo (78) affermarono che anche gli acidi, gli alcali e i sali possono determinare la riunione dei microorganismi in ammassi come fanno i sieri specifici.

Landsteiner e Sturli (79) constatarono che il siero normale di alcuni animali contiene più sostanze agglutinanti per varie specie di globuli. Ammisero che quando un siero diventa inattivo verso i globuli coi quali è stato trattato, questi non abbiano fissato l'agglutinina, ma invece abbiano ceduto al siero una sostanza che combinandosi all'agglutinina ne impedisca l'azione.

In ogni modo l'agglutinina del siero sarebbe sempre specifica, perchè permane l'attività di esso verso altri eritrociti. Questo modo di vedere del resto contrasta con le ricerche di altri e specialmente di Bordet (39) e dello

stesso Landsteiner (75 e 91). Kraus e Ludwig (80) trovarono che le culture di alcuni microorganismi contengono sostanze emolitiche ed emoagglutinanti.

Lo Monaco e Panichi (81), riprendendo le loro precedenti ricerche (54), sostennero che il potere isoagglutinante del siero di malarici è differenziabile da quello che si osserva in altre condizioni nel siero umano, per il suo speciale comportamento di fronte alla diluizione con soluzione fisiologica, o con soluzioni di chinina. Queste idee furono confutate in un mio lavoro (82) nel quale si dimostrò ancora come avvenga una combinazione fra le isoagglutinine del siero umano e gli eritrociti. Halban e Landsteiner (83), confrontando il sangue materno con quello del neonato, giunsero alla conclusione che in questo esistono bensì le sostanze attive del siero (le agglutinine e lisine comprese) ma non nella misura che raggiungono nell'adulto. Klein (84), in tre lavori, ottenne sui globuli rossi risultati in alcuni punti analoghi a quelli di Pick (85) sui bacteri.

Egli trovò negli estratti di eritrociti *etero*, *iso* ed *autoagglutinine* le quali per altro non sarebbero sempre in rapporto con quelle eventualmente contenute nel siero. Similmente dimostrò negli eritrociti una *sostanza agglutinabile* (stroma, come è stato veduto anche da altri); una *sostanza precipitabile* (mediante azione di un dato siero sull'estratto dei globuli rossi), e una *precipitante* (azione degli estratti fra loro).

È probabile che in questi fenomeni si tratti di proprietà comuni a molte sostanze vicine agli albuminoidi, di agglutinare i globuli rossi e di dare con grande facilità precipitati. Certo che l'agglutinazione che si verifica fra eritrociti integri con un dato siero, non è in relazione con quella che si può avere mediante estratti artificiali. Infatti l'A. ha veduto che dei sieri che agglutinano certi eritrociti non dànno precipitato con estratti dei medesimi. Di più, trattando animali da esperimento con eritrociti di altra specie animale, si ottiene talvolta un siero che agglutina questi eritrociti, ma è del tutto sprovvisto del potere di precipitare gli estratti dei medesimi. Camus e Pagniez (86) riscontrarono nel sangue umano isolisine, che non erano in alcun rapporto con le variazioni leucocitarie del sangue stesso nei diversi casi. Bezzola (87) confermò i miei risultati escludendo ogni valore diagnostico all'isoagglutinazione che si può ottenere coi sieri dei malarici. Osservò raramente potere isolitico nel sangue di malati, e dubita che queste emolisine siano prodotti di origine microbica non paragonabili quindi alle lisine di Ehrlich e di Bordet. Nicolle e Trenel (88) dimostrarono che ogni bacterio facilmente agglutinabile è anche facilmente agglutinogeno, ossia può determinare la comparsa del potere agglutinante nel siero di animali ai quali venga iniettato. Neufeld (89) emise intorno alla natura dell' agglutinazione una teoria che coincide nei suoi punti principali con quella di Bordet (39).

Jehle (90) vide che il siero del feto possiede minima o nulla virtù agglutinante sul bacillo di Eberth, perfino quando la madre contragga l'infezione nella 2ª metà della gravidanza. Landsteiner (91) ottenne dai corpi agglutinati le sostanze agglutinanti dopo che erano state da essi assorbite. Halsey (92), da animali immunizzati con lo stroma ed il sangue lacca di conigli e di polli, potè avere un siero dotato di alto potere litico ed agglutinante. Risultati incostanti e non paralleli fra la produzione di emolisine ed

emoagglutinine si ebbero iniettando a conigli soluzioni acquose di sangue d'altri animali, o di emoglobina. Recentemente è riuscito a Noguchi (93) di riscontrare emoagglutinine ed emolisine in animali a sangue freddo, o di produrle in essi con opportuno trattamento.

***

Nelle indagini istituite mi sono occupato:

A) Del potere isoagglutinante del siero di sangue umano come mezzo diagnostico.

B) Delle isoagglutinine umane, e del meccanismo della isoagglutinazione nel siero umano.

C) Dei rapporti della normale disposizione dei globuli rossi a rotoli di monete con l'isoagglutinazione e l'autoagglutinazione.

D) Delle isolisine umane.

E) Della influenza della milza sulla produzione delle emoagglutinine ed emolisine del siero.

Prima di esporre i risultati delle ricerche fatte, credo necessario descrivere la tecnica adoperata, e stabilire i criterî dai quali sono partito per l'osservazione dei fenomeni. Molti dei risultati ottenuti da varî autori non sono fra loro paragonabili appunto per le diverse condizioni di esperimento. Mi è sembrato di raggiungere nelle prove la maggiore precisione, e nello stesso tempo quella facilità che è indispensabile nelle indagini a scopo di diagnosi, valendomi spesso di un metodo presso a poco simile a quello adoperato da molti per l'esecuzione della prova di Vidal, e operando come segue:

Si lava bene con etere il polpastrello di un dito, e quindi si punge con un grosso spillo o con una lancetta sterilizzata. Dopo aver allontanato con una pezzuola ben pulita le prime gocce di sangue, si raccoglie questo in un tubicino capillare lungo circa 15-18 centimetri, del diametro di circa metà o due terzi di millimetro, in modo che il sangne, salendo per capillarità, non giunga a riempire tutta la lunghezza del tubo, ma circa i due terzi. Allora inclinando il tubicino verso l'estremità non ancora occupata dal liquido, si fa prendere alla colonna la porzione mediana del tubo, in modo che rimangano 2 centim. circa di spazio libero alle due estremità, e si chiudono queste con una piccola fiamma. Vari tubicini di sangue così raccolto si collocano dopo qualche tempo in una centrifuga, avvolti in un poco di cotone idrofilo, e si centrifugano non troppo fortemente. Il coagulo viene in tal modo spinto verso una delle estremità del tubo, e al disopra di esso vi è siero limpido. Rompendo il tubicino dove termina il coagulo, ed aprendolo pure dalla parte opposta si ottengono gocce di siero.

Nei singoli casi, il siero così raccolto venne saggiato in riguardo alle sue proprietà isoagglutinanti (ed eventualmente isolitiche), allo stato di purezza o dopo diluizioni. Operando su piccole quantità di materiale, le diluizioni si

fecero aggiungendo in un vetrino da orologio ad una goccia di siero 1, 2, 3 gocce di soluzione di NaCl al 0.85 per cento, e diluendo poi, se era ancora necessario, una goccia della prima miscela in un altro vetrino. Per diluizioni di maggiore entità si raccoglieva del siero da vari tubicini in un vetro da orologio, e si aspirava in una sottile pipetta graduata. Si poneva in un nuovo vetrino la quantità misurata di siero, e si diluiva con 1, 2 volumi eguali di soluzione fisiologica aspirata con la stessa pipetta. Ad una goccia di siero così raccolto (diluito o no) si aggiungeva su di un coprioggetti una piccola quantità di sangue intiero di un altro individuo, o di globuli presi dal sangue defibrinato lavati o no in soluzione al 0.85 per cento di NaCl.

Per una sola osservazione microscopica di saggio, poteva bastare quella piccola quantità di globuli che rimaneva aderente all'estremità di una sottile bacchetta di vetro precedentemente ben pulita e sterilizzata. Questa bacchettina serviva poi a mescolare convenientemente il siero coi globuli agglutinabili, anche quando questi fossero stati aggiunti in maggior quantità a mezzo di una piccola ansa. Eseguito il miscuglio, si capovolgeva il vetrino su di un portaoggetti incavato e si esaminava il preparato a goccia pendente a vari ingrandimenti. L'osservazione avrebbe potuto farsi senza dubbio anche su di un portaoggetti comune, ma mi è sembrato che la pressione del coprioggetti, per quanto lieve, modificasse sempre l'aspetto del fenomeno, mentre la goccia pendente è meglio sottratta alle influenze esterne (specialmente se si ha cura di ungere con vaselina i bordi del preparato) e, come è noto, rappresenta il sistema sempre adoperato per l'osservazione microscopica dell'agglutinazione dei bacteri, che rientra nello stesso genere di fenomeni di quella dei globuli rossi. Se infatti, invece di adoperare il portaoggetti incavato, si adopera un portaoggetti piano e si schiaccia il preparato, l'agglutinazione tende a dissociarsi e può sparire del tutto. Questo sistema quindi (che pure è stato adoperato da alcuni) non dà garanzie sufficienti per l'osservazione esatta del fenomeno. Merita appena che io faccia menzione dell'altro metodo, pure adoperato, di mescolare nell'istesso preparato su portaoggetti piano, sangue con sangue. Riuscirà sempre molto difficile in questo caso stabilire a quale dei due sangui appartengano i globuli agglutinati: senza dire che il gran numero di eritrociti toglie spesso ogni chiarezza alla preparazione. È necessario invece, per aver preparati chiari, servirsi di siero perfettamente libero dei propri globuli, ciò che si ottiene agevolmente, come sopra è detto, separandolo dal coagulo con la centrifugazione.

Un certo numero di saggi per constatare prontamente se un siero era o no agglutinante, è stato eseguito col metodo or ora descritto. In successive esperienze ho dovuto impiegare quantità più grandi di siero e rispettivamente di corpuscoli. Per comodità di ricerca, e per ovviare alla possibile obbiezione (81) che il metodo adoperato per ottenere siero umano influisca sul suo potere isoagglutinante, ho eseguito numerose prove di controllo facendo agire uno stesso siero attivo, raccolto in varie guise, sugli stessi globuli agglutinabili lavati. Il siero si raccoglieva:

1° Per decantazione da sangue preso con salasso e lasciato coagulare in grandi provette a temperatura ambiente;

2° Per centrifugazione da sangue preso con puntura dal dito e lasciato coagulare in tubetti capillari;

3° Per decantazione, o per centrifugazione da sangue defibrinato.

In tutti e tre i casi è stato ripetutamente saggiato il potere agglutinante del siero col metodo delle diluizioni. Come era da prevedersi, non fu trovata differenza di comportamento fra il siero raccolto nel primo e nel secondo modo. Il siero lievemente emoglobinico raccolto da sangue defibrinato in matracci, mediante *prolungata* agitazione con pezzetti di vetro, resiste talora ad una maggiore diluizione: esso cioè può acquistare un potere agglutinante più forte. Questo fatto si spiega forse con l'ammettere che possano passare nel siero sostanze agglutinanti contenute, secondo le ricerche di Klein (84), negli eritrociti.

Mi sono avvalso dunque del sieri raccolti indifferentemente nel 1° o nel 2° modo, a seconda dei casi.

Era anche necessario vedere, se, di fronte ad uno stesso siero attivo, era o no diverso il comportamento degli stessi globuli agglutinabili ad esso mescolati, a seconda del mezzo in cui essi erano già precedentemente immersi. Ho cercato cioè di stabilire il comportamento di un siero isoagglutinante di fronte:

1° A sangue intiero;

2° Allo stesso sangue defibrinato;

3° A globuli dell'istesso sangue lavati in soluzione al 0.85 % di NaCl.

Già Bordet (23) aveva veduto che l'agglutinazione, in un siero attivo, verificavasi anche in presenza del siero del sangue agglutinabilo. Nelle mie ricerche ho proceduto mescolando ad un'ansa grande di siero agglutinante. una più piccola di globuli o di sangue intiero o defibrinato. In tutti e tre i casi l'agglutinazione si verifica ugualmente, e non vi ha un comportamento diverso del siero attivo raccolto indifferentemente nei due modi suddetti. Per le ricerche sul meccanismo dell'agglutinazione ho preferito di adoperare sempre globuli lavati. Il lavaggio si faceva centrifugando in grandi provette il sangue defibrinato, aspirandone con una pipetta il siero e aggiungendo agli eritrociti la soluzione di NaCl al 0.85 %, rimescolandoveli. Si separava quindi la soluzione fisiologica con una nuova centrifugazione, si aspirava e ve se ne aggiungeva dell'altra, ripetendo più volte il procedimento, fino a tanto che le emazie non si fossero liberate più che era possibile del loro siero. Per queste manovre i globuli rossi non perdono la loro agglutinabilità, nè l'acquistano se prima non l'avevano, e all'osservazione microscopica si mostrano benissimo conservati.

Quando un siero è fortemente attivo, il fenomeno dell'agglutinazione degli eritrociti è già visibile ad occhio nudo: nella goccia di siero limpido si ha un vero precipitato granulare di eritrociti riuniti in enormi ammassi. Al microscopio non è più riconoscibile la primitiva forma dei singoli elementi, nè la loro normale disposizione a pile: essi sono come impastati fra loro, e le singole masse tendono ancora a riunirsi formando un grossolano reticolato a larghe maglie.

Da questa agglutinazione tipica alla notissima disposizione a rotoli di monete, che gli eritrociti assumono nel loro proprio siero, o in un siero non agglutinante, vi sono, nei casi diversi, infinite gra-

dazioni. Talora fra gli ammassi irregolari si vede qualche pila più o meno deforme, talvolta si vedono molte pile regolari e scarsi ammassi irregolari, o pure sole pile.

Anche la disposizione a pile può essere ritenuta un fenomeno di agglutinazione. Shattock (49) per primo ha emesso questa idea, e, indipendentemente da lui, anch' io (67) e, quasi contemporaneamente, M. Ascoli (68), abbiamo manifestata la stessa opinione. Tuttavia già fin d'allora fui indotto ad ammettere una distinzione fra agglutinazione in ammassi, agglutinazione a pile sole, e mista. Risulta infatti, come vedremo, che l'aggruppamento a pile deve essere distinto da quello in ammassi irregolari, che costituisce la *vera* agglutinazione. Quando i globuli rossi si dispongono in sole pile regolari, come accade di solito nel loro siero, la diluizione di tal siero a parti eguali con la soluzione fisiologica distrugge (nell'uomo) ogni agglomerazione di eritrociti, che restano uniformemente emulsionati nel siero diluito: mentre invece l'agglutinazione in ammassi irregolari, o mista, resiste sempre alle diluizioni, talora fortissime. Si dirà dunque che un siero è agglutinante verso certi dati globuli, quando ne determina, anche se diluito, una evidente riunione in ammassi. La formazione di sole pile sarà ritenuta come risultato negativo.

Del potere isoagglutinante del siero umano come mezzo diagnostico.

Una prima serie di osservazioni venne fatta sui malarici per vedere se il siero del sangue di questi malati avesse potere isoagglutinante, e se tale carattere fosse utilizzabile per la diagnosi, come era stato asserito de precedenti osservatori (54, 81). Era necessario inoltre fare, come controllo, altre esperienze col siero di individui affetti da svariate malattie e con quello di sani. Il potere isoagglutinante venne saggiato mescolando un'ansa grande di siero ad un'ansa piccola ($^1/_{10}$ circa della prima) di sangue intiero o defibrinato di individui sani, e talora anche di malati; o di globuli di sani, lavati e sospesi nella soluzione fisiologica. In tali indagini mi sono servito dei malati ricoverati nell'ospedale di Santo Spirito in Roma (sezione Alessandrina, diretta dal prof. A. Bignami). Come sangue di sani ho adoperato il mio sangue (sangue *C*), quello di due infermieri giovani e robusti (sangue *A*, sangue *B*), e di un altro individuo sano, il quale ha fornito di quando in quando, mediante salasso, una discreta quantità di sangue, dal quale si traevano gli eritrociti col

lavaggio in soluzione isotonica (globuli *D*) (1). Queste varie qualità di sangue adoperate non mostravano all'osservazione microscopica (in preparati a fresco fatti tanto con sangue intiero, che defibrinato) alcuna alterazione: le emazie si presentavano di forma normale e sempre tendenti a riunirsi in pile regolari.

Il prodursi dell'agglutinazione vera, come è stata più sopra descritta, è sempre favorito dal rimescolamento degli eritrociti agglutinabili nel siero attivo, o anche semplicemente, nelle goccie pendenti, da lievi movimenti di inclinazione impressi al coprioggetti. Le esperienze fatte col siero di malarici, ed esposte nella tabella seguente, furono eseguite dopo che in ogni caso era stata accertata la diagnosi con l'esame del sangue.

---

(1) Nelle tabelle che seguono, l'abbreviazione PA vuol dire *potere agglutinante*, che fu saggiato col metodo delle diluizioni; ed il risultato ottenuto in ogni caso è stato riportato nella rispettiva colonna indicando (come si usa) con un rapporto quante volte 1 volume di siero era stato diluito con *n* volumi di soluzione isotonica. Quando vicino al rapporto che indica il PA non è fatta alcuna menzione del sangue agglutinabile adoperato in quella prova di resistenza del siero, significa che la prova stessa fu potuta eseguire con tutte le specie di sangue (e coi globuli) verso le quali il siero si mostrava attivo.

Altrimenti è indicata la provenienza degli elementi agglutinabili che si adoperarono nel saggio della resistenza del siero alla diluizione. In tutte le ricerche la soluzione di NaCl adoperata fu al 0.85 %, meno che in quelle fatte sui malarici, nelle quali si adoperò una soluzione al 0.90 % (anche per il lavaggio dei globuli *D*): e ciò per mettersi nelle identiche condizioni di altri osservatori che si erano occupati dell'istesso argomento. Per le ricerche sui sani si utilizzarono anche i sieri dei sangui agglutinabili *A*, *B*, *C*, *D* ed altri sieri, contrassegnati da altre lettere maiuscole. Nelle singole colonne il segno + indica che è stata riscontrata l'agglutinazione, il segno — indica l'opposto, che cioè il fenomeno non fu osservato, e che nel preparato si vedevano soltanto pile regolari. I segni + e — uniti indicano l'agglutinazione mista: e dove il segno + precede il — gli ammassi irregolari prevalgono sulle pile, viceversa se il segno — precede il +. Il segno *o* significa che la relativa indagine non fu fatfa, perchè, trattandosi di ricerche sull'uomo, si comprende come non sia stato possibile in ogni caso eseguire tutti i confronti desiderabili. Nelle tabelle è notato ancora quando si è riscontrata la emolisi.

TABELLA I.

Sieri di malarici.

N. d'ordine	Forma clinica della malaria	Sangue *A*	Sangue *B*	Sangue *C*	Sangue e globuli *D*	Resistenza del P. A alla diluizione
1	Terzana comune. . . .	+	0	+ —	0	1/15 (sangue *A*)
2	Id.	+	+ —	+ —	+ —	1/15 (sangue *A*)
3	Quartana.	+	+ —	+ —	0	1/5 (sangue *A*)
4	Terzana comune. . . .	— +	0	—	0	0
5	Terzana estiva	+	+	+ —	+	1/10
6	Quartana.	— +	0	—	— +	1/2
7	Terzana estiva	0	—	—	—	0
8	Terzana comune. . . .	—	—	— +	—	0
9	Terzana estiva	+	+	+ —	+	1/10
10	Id.	+ —	0	+	0	0
11	Quartana doppia. . . .	+	+	+	+	1/30
12	Terzana comune. . . .	+	0	+ —	+ —	0
13	Id.	—	—	—	—	0
14	Cachessia (semilune). .	+	0	0	+	1/40 (globuli *D*)
15	Terzana comune. . . .	+ —	+ —	+ —	0	0
16	Id.	+ —	+ —	0	0	0
17	Id.	—	0	0	—	0
18	Id.	—	0	—	— +	0
19	Id.	0	—	—	0	0
20	Quartana.	+	+ —	+ —	+	1/12 (globuli *D*)
21	Terzana estiva	+	+	+	+	1/20
22	Cachessia (semilune). .	0	+	+	+	1/25 (sangue *C*)
23	Quartana.	+ —	0	+	+ —	0
24	Terzana estiva	+	+	+	+	1/30 (globuli *D*)
25	Quartana.	— +	— +	— +	— +	1/12
26	Terzana comune. . . .	+ —	+ —	+ —	0	1/8 (sangue *A*)
27	Id.	0	+ —	+ —	0	1 : 20

N. d'ordine	Forma clinica della malaria	Sangue *A*	Sangue *B*	Sangue *C*	Sangue e globuli *D*	Resistenza del P. A alla diluizione
28	Quartana.	+	+	+ —	0	1 : 20
29	Id.	+	+ —	0	+ —	0
30	Terzana estiva	0	+ —	+ —	0	0
31	Id.	0	—	—	—	0
32	Cachessia (semilune). .	+ —	0	+	+	1/60 (globuli *D*) (sangue *C*)
33	Perniciosa	+	+	+	+ —	1/20
34	Terzana comune. . . .	0	0	+ —	+ —	1/3

NB. I numeri 21 e 24 erano affetti da emoglobinuria da chinina. I sieri 11 e 33 si mostrarono sempre isoagglutinanti in moltissimi saggi. Nei casi in cui non si notò agglutinazione (pile sole), la diluizione del siero a parti eguali, con soluzione al 0. 90 % di *Na Cl*, determinava la scomparsa delle pile. I sieri agglutinanti non determinano alcun precipitato nel siero del sangue agglutinabile, e resistono per 3 minuti a 60°.

Non ho qui riportato per intiero tutte le ricerche fatte coi sieri dei malarici. Ho preferito di raccogliere le più tipiche, avendo constatato in 142 casi diversi che il comportamento del siero è incostante, come si vede dai risultati esposti nella tabella. Spesso si ha un'agglutinazione mista, abbastanza frequentemente un'agglutinazione in soli ammassi irregolari, talvolta nessuna agglutinazione. Il siero di malarici chinizzato *in vivo* (cioè somministrando per bocca o iniettando chinina) non subisce modificazioni del P. A. Così pure le soluzioni di chinina, aggiunte in vitro al siero, non modificano (come ho già dimostrato (67, 82) il suo P. A, se non in quanto agiscono diluendolo. Per queste ragioni io fui già indotto a ritenere che nulla di specifico vi ha nei fenomeni di isoagglutinazione, che si possono ottenere col siero di malarici, e che quindi tali fenomeni non possono essere utilizzati per la diagnosi di malaria. Questa opinione è convalidata dai risultati ottenuti in altri individui sani e malati (v. successive tabelle), risultati che furono in parte già da me pubblicati (l. c.) e che sono già stati confermati da molti autori (vedi letteratura).

Avendo osservato che, fra i malarici, gli individui che erano più profondamente anemici davano un siero maggiormente agglutinante, ho eseguito, su individui affetti da anemie primitive o secondarie, una serie di ricerche riportate nella seguente

TABELLA II.

Sieri di anemici.

N. d'ordine	Forma clinica dell'anemia	Sangue *A*	Sangue *B*	Sangue *C*	Sangue e globuli *D*	Resistenza del P. A alla diluizione
1	Secondaria ad enterite .	0	+	+	0	1/5 (sangue *C*)
2	Secondaria ad anchilostoma.	0	+	+	+	1/20
3	Primitiva	+	+	+ —	+ —	1/10 (sangue *A*)
4	Perniciosa	+	+	+	+	1/40
5	Secondaria a metrorragia da fibromioma uterino.	+	+	+	+	1/30 (globuli *D*)
6	Secondaria a metrorragia per aborto.	0	0	+	+	1/3
7	Secondaria gastrorragia per ulcera.	—	—	—	0	0
8	Id. (altro individuo) .	+	+	+	0	0
9	Primitiva	+	+	+	0	1/20
10	Id.	—	—	—	—	0
11	Secondaria a grave emorragia interna per ferita.	+	+	+	0	1/3
12	Clorosi	+	+ —	+ —	+	0
13	Id.	0	+	+	0	1/10 (sangue *C*)
14	Id.	— +	0	—	— +	0
15	Id.	+	+	0	0	1/10
16	Id.	+	+ —	+ —	+	1/15 (globuli *D*)

NB. Il siero N. 2 era emolitico per il sangue *B* ed apparteneva ad un bambino di 20 mesi. I sieri nn. 7 e 10 diluiti a parti eguali con soluzione fisiologica non agglutinavano più, neanche in pile, il sangue di un altro individuo. Il siero del N. 10 appartenente ad un individuo fortemente anemico da causa apparentemente ignota aveva un forte potere autoagglutinante e rimase costantemente sprovvisto di potere isoagglutinante. — I sieri non perdono a 60° la loro proprietà agglutinante, e non dànno precipitati col siero del sangue agglutinabile.

I risultati riferentisi ad individui affetti da svariate malattie sono esposti in questa

TABELLA III.

Sieri di individui affetti da varie malattie.

N. d'ordine	Malattia	Sangue *A*	Sangue *B*	Sangue *C*	Sangue e globuli *D*	Resistenza del P. A alla diluizione
1	Tubercolosi polmonare .	0	+	+	0	1/12 (sangue *C*)
2	Id.	+	0	+	+	1/12
3	Id.	+	0	+	+	1/40
4	Id.	+	0	+	0	1/80 (sangue *C*)
5	Enterite cronica. . . .	0	—	+	0	1/50
6	Nefrite acuta.	0	0	+	—	0
7	Porpora emorragica . .	+	—	+	0	0
8	Cancro dello stomaco. .	+	0	+	+	1/20
9	Ittero catarrale	+	0	+	0	0
10	Ittero grave	0	+	+	0	1/30 (sangue *C*)
11	Diabete	+ —	0	+ —	0	0
12	Mielite diffusa	+ —	0	+	0	0
13	Pleurite essudativa . .	0	0	+	0	1/10
14	Cirrosi epatica	0	0	+	+	1/5
15	Polmonite	—	—	—	—	0
16	Id.	— +	— +	—	0	1/1

N. d'ordine	Malattia	Sangue *A*	Sangue *B*	Sangue *C*	Sangue e globuli *D*	Resistenza del P. A alla diluizione
17	Tifo	+	+	+	0	0
18	Id.	+	0	+	+	1/30
19	Sifilide secondaria . . .	+	0	0	+	0
20	Sifilide terziaria. . . .	+ —	0	+ —	0	0
21	Morbillo	+	+	0	0	0
22	Difterite	0	+	0	+	0
23	Reumatismo articolare .	0	+	+	+	1/15 (globuli *D*)
24	Bronchite	0	— +	—	—	0
25	Vizio cardiaco	—	—	0	0	1/1
26	Id. (ascite).	— +	0	+	0	0
27	Arteriosclerosi	—	—	0	—	0
28	Meningite	0	— +	— +	0	0
29	Epilessia.	0	0	—	0	0
30	Mioclonia	—	0	—	—	0
31	Parotite	0	+	—	0	0
32	Nefrite cronica	0	+	+	+	1/10

NB. Il siero N. 4 era emolitico pel sangue *C*. L'essudato del N. 13 era emoagglutinante. Erano pure agglutinanti i trasudati dei numeri 14, 26, 32. — I sieri non agglutinanti diluiti a parti eguali con soluzione di *Na Cl* al 0. 85 °/₀ perdono anche la proprietà di agglutinare in pile. — Nessun precipitato si forma tra il siero agglutinante e quello del sangue agglutinabile. I sieri agglutinanti resistono alla temperatura di 60° per qualche minuto.

Le esperienze fatte con sieri di individui sani sono riportate in questa

TABELLA IV.

Sieri di individui normali.

N. d'ordine	Sieri	Sangue *A*	Sangue *C*	Sangue e globuli *D*	Resistenza del P. A alla diluizione
1	Siero *C*	—	—	0	0
2	Id.	—	—	—	0
3	Siero *E*	—	+	0	1/10
4	Siero *A*	—	— +	+	1/5 (globuli *D*)
5	Id	—	— +	0	1/2
6	Siero *B*	+ —	+	+	1/8
7	Siero *F*	+ —	+	+	1/15
8	Siero *H*	—	—	—	0
9	Siero *I*	—	—	—	0
10	Siero *L*	— +	— +	—	1/1
11	Siero *N*	+	+	+	1/15
12	Siero *D*	—	—	—	0
13	Siero *K*	—	—	—	0
14	Siero *R*	— +	—	—	0
15	Siero *S*	— +	—	—	0
16	Siero *T*	—	—	—	0

NB. Le esperienze coi sieri *A*, *C* vennero più volte ripetute dopo digiuno, strapazzo o dopo il pasto, senza che si trovasse un comportamento diverso del siero in queste diverse condizioni. — Il siero *B* si trovò provvisto di potere emolitico per i globuli *C*. I sieri *F*, *N* si sono mostrati in molti saggi, fatti nelle condizioni più diverse, sempre isoagglutinanti. — Nei casi in cui non si notò agglutinazione in ammassi, la diluizione del siero con soluzione di $Na\,Cl$ al 0.85 °/₀ a parti eguali, determinava la scomparsa delle pile. Nei casi in cui si constatò potere isoagglutinante il siero del sangue agglutinante non dava alcun precipitato con quello del sangue agglutinabile. Il *P. A* del siero resiste anche a 60° per qualche minuto.

Da queste ricerche risulta che il siero del sangue umano possiede abbastanza spesso in condizioni patologiche, e talvolta anche in condizioni normali, potere isoagglutinante verso i corpuscoli rossi. Tale proprietà del siero non può quindi essere utilizzata, come pel primo propose Grünbaum (l. c.), nella diagnosi delle malattie, tanto più che influisce su essa la diversa provenienza degli eritrociti agglutinabili.

I risultati tuttavia, che ho creduto di dover riportare, sebbene già il loro risultato negativo dal lato diagnostico potesse prevedersi, si prestano ad altre considerazioni, ed aprono il campo a nuove indagini. Anzitutto è da domandarsi in che consistano questi fenomeni di emoagglutinazione nell'uomo, e se essi siano dovuti alla presenza di speciali sostanze nel siero, come si verifica negli animali preparati.

Alcuni punti della questione mi sembrano già ben chiariti. È certo intanto che, nelle nostre esperienze, l'agglomerarsi degli eritrociti è indipendente dalla coagulazione del sangue perchè si verifica anche mescolando al siero sangue defibrinato, o globuli lavati nella soluzione fisiologica.

Il potere emoagglutinante del siero di sangue umano resiste, come quello degli animali preparati con iniezioni di sangue eterogeneo, a temperature elevate, che distruggono di regola i complementi. Questo modo di comportarsi è del tutto analogo a quello dei sieri che agglutinano i bacteri.

L'agglutinazione degli eritrociti, come quella dei microorganismi, non è dovuta ad un eventuale precipitato (Kraus, l. c.) fra il siero agglutinante ed il siero del sangue agglutinabile, perchè, mescolando i due sieri, non si è mai avuta precipitazione, e perchè il fenomeno si verifica lo stesso se si mescolano al siero agglutinante globuli lavati e sospesi nella soluzione fisiologica, invece del sangue defibrinato, o del sangue intiero.

Vi ha inoltre, come nei sieri di alcuni animali, una specie di elettività di quello umano normale o patologico verso una data qualità di corpuscoli rossi. Esistono dunque in esso sostanze specifiche agglutinanti gli eritrociti?

Questa questione mi sono proposto di risolvere, impiegando *nell'uomo* il metodo dell'assorbimento elettivo di Ehrlich, già adoperato da Bordet, da Malkoff e da altri (vedi letteratura) in ricerche sul potere emoagglutinante del siero di animali.

Ognuna delle esperienze qui sotto riportate è stata da me più volte controllata.

Isoagglutinine umane, e meccanismo della isoagglutinazione nel siero umano.

Esperienza I. — Si fa un piccolo salasso ad un malato (Tabella I, n. 33) convalescente di un grave attacco di perniciosa, apirettico, e che da tre giorni non ha preso medicinali di sorta. Si era veduto già che il siero di questo individuo aveva forte potere agglutinante sui sangui *A*, *B*, *C*, *D*. In ogni caso l'agglutinazione era visibile anche con la diluizione di 1:20. Si fa un salasso anche all'individuo sano *D*, e si lavano in soluzione fisiologica i globuli rossi di quest'ultimo, come sopra è detto.

Separato il siero agglutinante limpido dal coagulo, se ne mettono 10 cmc. circa in una provetta contenente un eccesso di globuli lavati *D* sospesi in poca soluzione fisiologica (stipati mediante prolungata centrifugazione). Si agita la miscela con una bacchetta di vetro e si lascia in riposo per 20 minuti circa. Quindi si centrifuga.

Aggiungendo al siero così trattato nuovi globuli lavati *D*, o anche il sangue *D* intiero, non si ha più nessuna agglutinazione, e nei preparati a goccia pendente si notano solo scarsi gruppi di pochi globuli disposti a pile regolari. Si ha invece sempre agglutinazione in ammassi se si aggiungono al siero i globuli del sangue *A*, o del sangue *C*.

Se si tornano ad immergere i globuli agglutinati *D* nel loro proprio siero, dopo averli liberati col lavaggio del siero agglutinante, essi si dispongono in pile regolari. Nella soluzione fisiologica si emulsionano senza aggrupparsi in verun modo.

Le esperienze successive sono state, nei dettagli, eseguite come la prima.

Esperienza II. — Siero di un malarico quartanario che ha avuto sifilide (Tabella I, n. 11): agglutina diluito 1:30. Trattato con un eccesso di globuli *A* perde notevolmente il potere agglutinante verso questi.

Basta una diluizione di 1:5 perchè i globuli *A* non siano più agglutinati. Si tratta il siero con altri globuli *A*, e si hanno allora risultati identici a quelli dell'esperienza precedente. Il potere agglutinante, perduto per i globuli *A*, è conservato invece per quelli *C* e *D*. I globuli agglutinati *A* (primitivamente aggiunti), lavati, assumono sempre nel proprio siero la disposizione a pile, e nella soluzione fisiologica non si aggruppano in nessun modo.

Esperienza III. — Siero di tifoso grave in 13ª giornata (Tabella III, n. 18). Agglutina 1:30. Trattato con un eccesso di globuli *D* perde il potere agglutinante per questi, ma lo conserva per gli eritrociti *C* ed *A*. Trattato di nuovo con un eccesso di globuli *A* perde il potere agglutinante anche verso questi e lo conserva, quantunque indebolito, per *C*. Il siero è diventato, per queste manovre, fortemente emoglobinico. Si ha lo stesso risultato che nelle esperienze precedenti, riguardo al comportamento dei globuli agglutinati *A* e *D* di fronte al loro proprio siero o alla soluzione isotonica.

Esperienza IV. — Siero di individuo affetto da tubercolosi polmonare (Tabella III, n. 3): agglutina diluito 1:40. Trattato con un eccesso di

globuli *D* perde il potere agglutinante verso questi, conservandolo invece, ma molto indebolito per quelli del sangue *C* (1 : 3), e perdendolo del tutto per quelli del sangue *A*.

Si mescolano ad un eccesso di siero agglutinante pochi globuli lavati *D*, si tolgono dopo mezz'ora, mediante centrifugazione dal siero, e si lavano nella soluzione isotonica. Questi globuli, tornati ad immergere nel loro siero, si dispongono in pile e nella soluzione fisiologica non si aggruppano in alcun modo. Immersi invece nel *siero agglutinante inattivato* (con un eccesso di globuli, come sopra è detto) tornano a riunirsi in ammassi, come pure se vengono portati nel *siero attivo*.

Esperienza V. — Siero di individuo sano (Tabella IV, n. 7): agglutina 1 : 15. Trattato con un eccesso di globuli *D* perde il potere agglutinante per questi ed anche per quelli del sangue *A*. Lo conserva, ma molto indebolito (1 : 2) per i globuli *C*. Anche in questo caso i globuli *D*, agglutinati da un eccesso di siero, lavati, si comportano come nell'esperienza precedente di fronte al proprio siero, alla soluzione isotonica, al siero reso inattivo, e a quello attivo.

Esperienza VI. — Siero di individuo sano (Tabella IV, n. 11); agglutina 1 : 15. Trattato con un eccesso di globuli *D* perde il potere agglutinante verso quelli *A* e *C*; non però verso i globuli di cavia, che pure agglutinava prima del trattamento. Gli eritrociti *D*, agglutinati da un eccesso di siero, lavati, si comportano come nelle due precedenti esperienze.

Da queste esperienze si deduce che la sostanza agglutinante è fissata dagli eritrociti agglutinabili in modo che il siero è reso inattivo verso di essi. Tale sostanza, *isoagglutinina del sangue umano*, si comporta qualche volta, di fronte ai globuli rossi di varia provenienza, come le agglutinine bacteriche specifiche di fronte a varie specie di microorganismi, in modo che si sarebbe portati ad ammettere, nei sieri di alcuni individui sani, la possibile esistenza di più isoagglutinine specifiche preformate. Questo punto della questione merita, a mio modo di vedere, di essere oggetto di nuove ricerche. Da quello che ho esposto risulta che la pluralità delle isoagglutinine è stata riscontrata effettivamente nei sieri patologici, ma non in modo costante: nei sieri normali il fatto sarebbe anche più dubbio. Malkoff (l. c.) giunse ad ammettere, nei sieri di animali sani, la presenza di più emoagglutinine specifiche per sangui di animali di specie diversa. Biffi (94) ammette recisamente nei sieri normali umani un'*unica* isoagglutinina attiva, su globuli di varia provenienza, ad essa variamente sensibili. Secondo Landsteiner (75), invece, le isoagglutinine dei sieri umani normali sarebbero molteplici. Il siero dei malati, secondo Biffi (l. c.), si comporterebbe spesso, ma non sempre, come quello dei sani. Ciò lascia supporre che anche egli, nei malati, abbia qualche volta riscontrato più di una sostanza

agglutinante. Ma comunque possa interpretarsi la circostanza della pluralità delle isoagglutinine, resta sempre bene stabilito che nel siero umano certamente esistono isoagglutinine, e che vi è un'avidità specifica di combinazione fra esse e i globuli agglutinabili. A questa avidità è intimamente legato il fenomeno dell'agglutinazione (1).

Ma sono da prendersi in considerazione altri fatti importanti. Gli eritrociti, che hanno fissato l'agglutinina, portati dopo lavaggio nella soluzione fisiologica, dànno un'emulsione omogenea, e nel loro siero si dispongono in pile. Non basta dunque l'agglutinina fissata perchè il fenomeno si produca: vi deve entrare un altro fattore che rimane nel siero, anche se reso inattivo. Infatti, questo agglutina sempre, come quando è ancora attivo (Esp. 4ª, 5ª, 6ª), gli eritrociti lavati che hanno assorbito la sua agglutinina, mentre non agglutina più gli stessi eritrociti nuovi. Da ciò risulta evidente che nel fenomeno dell'isoagglutinazione entrano due sostanze: l'una combinabile cogli eritrociti, l'altra che rimane nel siero, sebbene reso inattivo. Queste due sostanze isolatamente non hanno alcuna azione; infatti gli eritrociti combinati con la prima non si agglutinano se non interviene la seconda, e, rispettivamente, il siero, che non contiene più la prima, non è più agglutinante, non ostante che possegga ancora l'altra.

Secondo la teoria di Ehrlich, come abbiamo veduto, le agglutinine sono *ricettori di 2° ordine* (*unicettori complessi*) che posseggono un *gruppo aptoforo o combinabile* e un *gruppo funzionale o agglutinante* (*zimoforo*). Rispettivamente la sostanza agglutinabile deve possedere gruppi corrispondenti, e cioè un *gruppo combinabile* e uno *agglutinabile*. L'esistenza di questi gruppi specifici per le agglutinine bacteriche sembra che ormai passa ritenersi dimostrata, perchè appunto con essa potrebbero spiegarsi numerosi fatti sperimentali (95, 96).

Specialmente Wassermann (97) ha dimostrato che i bacilli del tifo e piocianeo, resi inagglutinabili con HCl $^1/_{10}$ N, possono ciò malgrado fissare notevoli quantità di agglutinina da un siero agglutinante rendendolo quasi inattivo, e servire anche a produrre un siero agglutinante specifico se iniettati negli animali. D'altra parte, un siero agglutinante, reso inattivo con HCl $^1/_8$ N, contiene ancora agglutinina combinabile, perchè i bacilli ad esso aggiunti possono fissarla (sebbene non restino agglutinati), come si vede dal fatto che

(1) La dimostrazione sperimentale di sostanze agglutinanti fissabili dagli eritrociti nel siero di sangue umano, fu da me data in una memoria preliminare (82), assai prima che il Biffi (l. c.), evidentemente senza conoscerla, giungesse a risultati non molto diversi.

essi ugualmente non si agglutinano anche se immersi in un siero non inattivato, essendo già stato occupato il loro gruppo aptoforo o combinabile. Questi fatti sarebbero, secondo il Wassermann, spiegabili ammettendo che l'acido abbia distrutto il gruppo funzionale più labile dell'altro gruppo combinante. E così sarebbe dimostrata la distinzione dei due gruppi specificamente combinabili per le agglutinine e per i bacilli del tifo e piocianeo.

Una dimostrazione simile non è possibile pei globuli rossi del sangue umano. L'azione di sostanze chimiche (acidi, formalina, sublimato) li altera talmente, che anche la normale disposizione a pile assume l'aspetto di una vera agglutinazione. D'altra parte una dimostrazione della teoria di Ehrlich, applicata direttamente alle isoagglutinine umane sarebbe desiderabile, perchè i risultati da me riportati non si troverebbero in pieno accordo con essa. Infatti, avendo aggiunto al siero agglutinante globuli rossi *inalterati*, la combinazione dei due gruppi aptofori e dei due gruppi funzionali dovrebbe essere, giusta il concetto di Ehrlich, completa, perchè il siero, che residua dalla reazione, è inattivato. Invece, come si è veduto, qualche cosa rimane nel siero inattivo, che è concausa della agglutinazione. Non si adatta poi al concetto di Ehrlich il fatto che i globuli, che hanno fissato l'agglutinina, seguitino ancora ad agglutinarsi fortemente e completamente nel siero non inattivato.

Infatti, essendo i loro gruppi aptofori occupati da quelli corrispondenti dell'agglutinina fissata, non potrebbe più avvenire la combinazione e quindi l'agglutinazione.

Risulterebbe da ciò che la teoria di Ehrlich non si adatta alla interpretazione dei fenomeni di isoagglutinazione del sangue umano. Mentre con essa si può spiegare il funzionamento delle agglutinine specifiche sôrte nel siero per un processo di immunizzazione (immunagglutinine), e quindi (Wassermann l. c.) anche delle agglutinine esistenti normalmente in alcuni sieri e identiche, secondo Ford (98), a quelle specifiche; le isoagglutinine umane normali, e quelle prodottesi in seguito a malattie sfuggono, almeno secondo le mie indagini, alla suesposta teoria.

Del resto devesi notare che la formazione di isoagglutinine, o al loro accidentale presenza nel siero umano, è un fatto talmente diverso dalla produzione di immunagglutinine negli esperimenti di Bordet e di Ehrlich e Morgenroth, che si comprende agevolmente come il geniale concetto delle *catene laterali* non possa trovarvi una completa applicazione. Infatti, non essendo stato adoperato alcun processo di immunizzazione per le isoagglutinine umane studiate,

la loro specificità, per così dire, di fronte a certi eritrociti deve ritenersi puramente accidentale. Analogamente a ciò, è stato più volte osservato che il siero umano normale può agglutinare varie specie di bacteri. Köhler (57) ha veduto, per esempio, che il siero delle clorotiche e degli itterici contiene spesso agglutinine per il bacillo del tifo.

Nel caso degli eritrociti, può darsi che la loro sostanza agglutinabile contenga (come i batteri, Wassermann l. c.) più gruppi (agglutinine parziali) ciascuno dei quali può o no trovare nel siero gruppi antagonisti combinabili.

Ne risultano fenomeni complessi e talora apparentemente non spiegabili.

La dottrina di Ehrlich, lungi dall'essere infirmata da questi fatti, ne riceve conferma; perchè appunto quando ci allontaniamo da un regolare procedimento di immunizzazione verso certi elementi cellulari, non possono più essere invocate le leggi esatte di combinazioni chimiche specifiche che costituiscono il fondamento della teoria stessa.

Il concetto di Bordet-Duclaux secondo il quale « l'agglutinina fissandosi ai globuli determina delle modificazioni nelle condizioni di attrazione molecolare fra i globuli stessi, e fra essi e il liquido ambiente, in modo che avverrebbe il loro agglomeramento, come avviene quello di molecole di sostanze apparentemente disciolte, quando se ne determina la coagulazione », dà una spiegazione del fenomeno fisico dell'unione di elementi sospesi in un liquido, per le note leggi d'attrazione molecolare. Ma pure, ammettendo necessariamente che il lato visibile dell'agglutinazione, costituito dall'ammassarsi degli elementi, sia un effetto di forze attrattive; rimane sempre inesplicabile perchè gli eritrociti, che hanno fissata l'agglutinina, debbano trovare queste condizioni di attrazione solamente nel siero attivo o inattivato, e non nel loro siero, o nella soluzione fisiologica, come si verifica per i bacteri che hanno assorbito (39) la sostanza agglutinante.

Allo stato attuale della questione mi sembra che si possa concludere solamente questo: le isoagglutinine umane contengono certamente un gruppo combinabile, e verosimilmente un gruppo attivo non combinabile cogli eritrociti.

Rapporti della normale disposizione dei globuli rossi a rotoli di monete con l'iso e l'autoagglutinazione.

Quando si mescolano eritrociti agglutinabili lavati con un siero agglutinante, ne risulta sempre, per quanto si cerchi di liberare i globuli della soluzione isotonica, che ha servito per lavarli, una diluizione del siero.

Nelle indagini fatte, ciò non può costituire una causa di errore, in quanto cioè il siero agglutinante possa perdere il suo potere. non per la fissazione dell'agglutinina, ma per la diluizione subìta. Infatti mi sono servito di sieri che agglutinavano fortemente anche se diluiti a 1/20, 1/30 e più, mentre alla fine dell'esperienza la diluizione del siero era sempre inferiore a 1 : 1, perchè si aveva cura, dopo di aver stipato i globuli lavati con la centrifugazione, di togliere la soluzione isotonica sovrastante con una pipetta e quindi, rapidamente, con un piccolo rotolo di carta bibula, prosciugare il liquido rimanente fino alla superficie del sedimento globulare, mescolandovi poi subito il siero agglutinante. Tuttavia una certa diluizione il siero la subisce come si vede (nei preparati a goccia pendente) aggiungendo ad esso i proprî globuli, o quelli che più non sono agglutinati. Si osserva allora una disposizione regolare in pile costituite da un numero *minore* di elementi di quello che si vede in un siero non diluito. Una piccola diluizione basta adunque a modificare l'aggruppamento in pile, una diluizione un poco più forte (1 : 1) le fa scomparire del tutto.

Questo, come ho detto più sopra, costituisce già una differenza costante tra la disposizione a pile e l'agglutinazione vera. Non si riesce inoltre, come anche il Biffi ha veduto (l. c.), a far perdere al siero il potere di agglomerare in pile i proprî eritrociti. Si comprende come sia impossibile ottenere ciò aggiungendo al siero un grande eccesso dei proprî globuli lavati in soluzione fisiologica. La inevitabile diluizione che ne risulterebbe, sarebbe già sufficiente a spiegare la mancata riunione in pile. D'altra parte se si aggiunggono al siero i proprî globuli non lavati, non si fa che aggiungere anche siero nuovo, e l'esperienza è resa impossibile. Ma nelle numerose ricerche fatte sull'assorbimento delle agglutinine, si è veduto che il siero, pure perdendo il potere di agglomerare in ammassi varie qualità di globuli, non perde *mai* la proprietà di riunire in pile i proprî, e anche quelli di qualsiasi provenienza. Si è dunque autorizzati ad ammettere che, se esiste nel siero del sangue umano

una sostanza che determina la formazione delle pile, essa è assolutamente diversa dalla sostanza agglutinante vera.

Si può pensare ad una speciale proprietà dei globuli rossi per la quale essi, immersi nel siero, possano essere soggetti, come accade talora alle particelle inerti immerse nei liquidi, a forze di attrazione capillare.

Particelle finissime di argilla in sospensione omogenea nell'acqua distillata precipitano in fiocchi in fondo al vaso, se si aggiunge al liquido un poco di cloruro sodico (39). Il Lauder Brunton (99) seguendo un'antica e geniale esperienza del Norris di Birmingham, ha veduto che dei pezzetti di sughero contenenti un pallino di piombo ed aventi la forma degli eritrociti, immersi nell'acqua (nella quale rimangono sospesi), non si attraggono fra loro; si attraggono invece se prima sono stati bagnati nel petrolio e si dispongono come veri globuli rossi a rotoli di monete. Essi si attraggono ancora se, essendo stati spalmati di sapone duro, si immergono in acqua acidulata, non si attraggono invece in acqua semplice. La natura dei liquidi influisce grandemente su questi fenomeni di attrazione capillare dovuti, come è noto, a modificazioni della tensione superficiale dei corpi e dei liquidi nei quali i corpi sono immersi.

D'altra parte gli eritrociti veri possono essere agglutinati (come i microorganismi) per azione di sostanze chimiche svariatissime (100) e specialmente di quelle che secondo Kobert (101) trasformano uno dei corpi albuminosi costituenti lo stroma, il quale, come è noto per le indagini di molti osservatori, prende parte, indipendentemente dall'emoglobina, alla formazione delle masse agglutinate. Tali sostanze sono specialmente la crotina, la ricina e l'abrina. Gli eritrociti dunque, come le particelle inerti e i bacteri morti, non si sottraggono alle comuni leggi di attrazione molecolare, siano o no queste, nel caso dell'agglutinamento, una manifestazione più grossolanamente visibile del processo di coagulazione.

Ed il siero umano può agglutinare anche le particelle inerti di inchiostro della Cina e di carminio, come in potei vedere (82) ripetendo le esperienze fatte da Salvioli sul siero di alcuni animali. Salvioli (102) ha trovato che tale potere agglutinante è dovuto alle normali globuline del siero. Nel suo lavoro, che ha preceduto di molto la numerosa serie di tutti gli altri scritti sulle agglutinine, egli dubitò che quella dei globuli rossi fosse una vera agglutinazione, come nel caso delle particelle inerti. Oggi, dopo le ricerche sull'attività emoagglutinante delle globuline (43. 76) e delle anti-

globuline (103), mi pare che non vi possano essere più dubbi sulla grandissima analogia di questi fenomeni. Anche gli essudati e i trasudati (che pure contengono siero-globuline), come è stato veduto da M. Ascoli (68), da me (82) e più recentemente dal Biffi (94), agglutinano i corpuscoli rossi.

Da tutti questi fatti mi sembra confermata la vecchia opinione che nel siero sanguigno esistano normalmente le condizioni di attrazione reciproca fra i dischetti biconcavi costituenti gli eritrociti, per cui essi, venendo a reciproco contatto coi loro bordi sporgenti, si dispongono a rotoli di monete. Infatti se si altera meccanicamente la forma dei globuli rossi (32), agitandoli a lungo in presenza di palline di vetro per la defibrinazione, o nella soluzione fisiologica, l'aggruppamento in pile acquista nel loro siero un aspetto del tutto diverso, e può somigliare ad una vera agglutinazione. E se si imprimono leggere scosse ad un preparato a goccia pendente di globuli rossi emulsionati in un eccesso del loro siero, la produzione di ammassi di pile è grandemente favorita, perchè gli eritrociti vengono posti a contatto o avvicinati in modo che possono farsi sentire fra essi le forze di attrazione molecolare a cui sono soggetti. Una piccola quantità di soluzione isotonica basta a modificare talmente le condizioni fisiche del liquido, che il fenomeno più non si verifica.

L'agglutinazione in pile è dunque ben distinta dall'agglutinazione vera. Nell'una e nell'altra interviene l'attrazione molecolare, ma mentre nell'aggruppamento a pile si tratta di un fatto fisico inerente alla primitiva natura dei corpi, siero e corpuscoli; nell'agglutinazione vera il fatto fisico non è che l'ultima conseguenza di fenomeni complessi. Nell'aggruppamento a pile gli eritrociti hanno una parte passiva, nell'agglutinazione vera hanno invece una parte attiva, in quanto debbono combinarsi con l'agglutinina.

Talora nei comuni preparati a fresco di sangue umano, preso dal dito, si osserva che i globuli rossi, invece di disporsi in pile regolari, si accumulano in ammassi informi (nei quali è poco o punto riconoscibile la disposizione a pile), che si disgregano difficilmente con la pressione sul coprioggetti. Il fenomeno è già stato descritto da vari autori, e specialmente da Hayem (104). È probabile, come egli sospetta, che la maggiore vulnerabilità degli eritrociti, estratti dal loro ambiente vasale, abbia influenza sull'insolito agglomeramento, perchè si vede appunto che questo va accentuandosi durante l'osservazione. È certo intanto che, come per l'agglutinazione in pile ed in ammassi, il fenomeno è indipendente dalla coagulazione, verificandosi anche nel sangue defibrinato.

Si può pensare alla formazione, *in vivo*, di una sostanza autoagglutinante. Infatti l'autoagglutinazione si osserva di preferenza in quei casi in cui si ha disfacimento globulare, come negli stati anemici e cachettici. Ne risulterebbe un processo di autoimmunizzazione di fronte agli eritrociti propri, e quindi alla produzione di autoagglutinine. Sperimentalmente la questione negli animali non è stata ancora risoluta. È riuscito ad Ascoli M. (68) e ad Hulot e Ramond (citati da Eisenberg) (74) di ottenere nei conigli con iniezioni del loro proprio sangue, potere isolitico ed isoagglutinante del siero, non autoagglutinante od autolitico.

Nell'uomo, in casi in cui presentavasi l'autoagglutinazione, non mi è riuscito a dimostrare col metodo dell'assorbimento elettivo di Ehrlich, la presenza di un'autoagglutinina specifica fissabile ai propri eritrociti e ciò perchè il sangue, defibrinato o no, per l'aggiunta di poca soluzione fisiologica, perdeva la proprietà autoagglutinante. Si avevano quindi le stesse difficoltà, accennate più sopra, che s'incontrano nella dimostrazione della ipotetica sostanza che riunisce normalmente in pile i globuli rossi. Negli individui che presentavano l'autoagglutinazione non mi si è dato mai il caso di non poter ottenere, come è accaduto al Biffi (l. c.), una sospensione omogenea dei globuli autoagglutinati nella soluzione fisiologica. Ho osservato inoltre che i sieri autoagglutinanti sono talora affatto sprovvisti di potere isoagglutinante verso i globuli di altri individui. Un anemico (n. 10, tabella II), osservato per lungo tempo, non presentò mai proprietà isoagglutinanti del suo siero, che pure possedeva marcatissimo il potere di agglomerare in ammassi irregolari i propri eritrociti. In questo caso si poteva ammettere che, data la presenza di un'autoagglutinina, questa si fosse già tutta combinata ai propri eritrociti, o pure non possedesse gruppi aptofori combinabili con quelli degli eritrociti aggiunti.

Tuttavia, oltre alla probabile presenza di una sostanza autoagglutinante, entra certamente nella produzione del fenomeno un altro fattore dovuto ad una speciale alterazione dei dischi biconcavi costituenti gli eritrociti, per la quale essi, attraendosi, non vengono ad aderire fra loro con i bordi sporgenti, formando i regolari rotoli di monete, ma in modo assai irregolare, agglutinandosi in ammassi informi. Vi sono vari argomenti a sostegno di questa opinione.

Dei globuli rossi normali, dopo che hanno subìto strapazzi meccanici (come ho detto più sopra), possono agglomerarsi in ammassi irregolari nel loro stesso siero che prima li agglutinava in pile; mentre che nella soluzione fisiologica formano un'emulsione omogenea e non

appariscono alterati. Inoltre i globuli autoagglutinati, trasportati in un altro siero qualsiasi non agglutinante, si dispongono in ammassi irregolari, e nella soluzione fisiologica non mostrano aggruppamento alcuno.

Dato che in speciali circostanze (ad esempio, di rallentamento della corrente sanguigna ed abbassamento della pressione), possano verificarsi in vivo nei piccolissimi vasi fenomeni di autoagglutinazione, si potrebbe con essi agevolmente spiegare il fatto osservato più volte da Marchiafava e Bignami (105) del grande accumulo di eritrociti nei capillari del cervello di alcuni individui morti per attacchi di perniciosa (forme cerebrali). In questi malarici si osserva costantemente *in vitro* un forte potere autoagglutinante. Se si aggiunge inoltre che i globuli parassitiferi, che in questi casi possono essere numerosissimi, sembrano diventati più vischiosi in modo che essi (anche per le osservate alterazioni dell'endotelio vasale) si addossano attorno alla superficie interna dei vasi e difficilmente giungono ad attraversarne la parete (Bignami, 106), si può trovare la ragione della forte concongestione locale e delle *trombosi agglutinative* che possono verificarsi in queste circostanze.

Delle isolisine umane.

Durante le ricerche sulla agglutinazione è accaduto qualche volta di vedere che il siero di alcuni malati possedeva potere isolitico, e una volta anche quello di un individuo sano (n. 6, tabella IV). In questo siero l'emolisi, che si iniziava subito, diveniva completa dopo 3 ore in termostato a 37° sui globuli del sangue *C*. È da notare che questi globuli non erano influenzati da altri sieri, neanche di emoglobinurici (nn. 21, 24, tabella I), e che il suddetto siero emolitico ed agglutinante per i globuli *C*, era anche agglutinante, ma non emolitico, per globuli di altra provenienza, e anche per i globuli dei due individui affetti da emoglobinuria.

Il potere emolitico del siero umano, già da tempo enunciato pel primo da Maragliano (44), è stato confermato da numerose ricerche fatte in vario senso sui sieri normali e patologici. I risultati a cui sono giunti i vari osservatori non si prestano ad un'unica interpretazione, appunto perchè i metodi di indagine seguiti non sono stati sempre gli stessi. Così forse si spiega come talora esista contraddizione fra essi. D'altra parte non bisogna aspettarsi dalle isolisine, che si trovano in alcuni sieri umani, quell'azione rapida e violenta che si ottiene con le emolisine degli animali preparati. Io ho veduto nei numerosi preparati

fatti per la ricerca delle isoagglutinine, che specialmente i sieri degli anemici e dei cachettici modificano spesso in modo notevole gli eritrociti. Nei bordi degli ammassi irregolari si vedono emazie completamente decolorate, qualche volta soltanto impallidite, e sempre deformi. Il siero del sangue di un bambino affetto da anchilostoma aveva forte potere emolitico per i globuli *B* (tabella II, n. 2), e ne era sprovvisto per quelli *D* e *C*. Similmente un tubercolotico (n. 4, tabella III) forniva un siero fortemente emolitico per il sangue *C*, e pochissimo per il sangue *A*.

Questi sieri emolitici erano anche contemporaneamente emoagglutinanti, e perdevano a 56° *C* (per 30′) il potere isolitico, man non l'altro. Non mi è mai accaduto di poter riattivare con un siero nuovo l'emolisina inattivata.

L'origine di queste sostanze nel siero umano è verosimilmente dovuta, in certi stati morbosi, alla distruzione di elementi non più utilizzabili, alla formazione, in altre parole, di autolisine. In alcune malattie acute interviene una accentuata emolisi per azione di emolisine bacteriche (80). Nell'emoglobinemia e nell'emoglobinuria debbono esistere in circolo, almeno in un dato momento, sostanze globulicide. Intanto per l'emoglobinuria da chinina nei malarici la dimostrazione di queste sostanze è stata impossibile *in vitro* (Pace l. c.; Bignami, 107). — Bignami (l. c.) spiega i risultati negativi da lui ottenuti tenendo conto della teoria dell'origine dell'emoglobinemia secondo la dottrina di Ehrlich. Secondo Ehrlich e Morgenroth (l. c.) infatti le lisine sono *ricettori di terzo ordine o ambocettori* (altrimenti, anticorpi) muniti di due gruppi aptofori, dei quali uno trattiene la sostanza da disciogliersi, l'altro attira a sè il fermento dissolvente o *complemento* (alessina). Perchè avvenga la dissoluzione del globulo rosso, è necessario ammettere che l'anticorpo sia già stato fissato dal gruppo aptoforo dell'eritrocito con esso combinabile: l'aggiunta del complemento, completa la formazione della lisina e produce la globulolisi. Nel caso speciale dell'emoglobinuria da chinina nei malarici, si può ammettere, secondo Bignami, che l'anticorpo (prodotto per opera dell'infezione) esista già combinato cogli eritrociti alterati. Il complemento *non* è rappresentato dalla chinina (come chiaramente dimostrano le indagini in vitro) ma dall'azione di questo alcaloide su di un organo speciale sinora ignoto; e, una volta formato, si combina coll'anticorpo; l'emolisi avviene e con essa l'emoglobinemia e l'emoglobinuria. Ma, come dimostrano le esperienze del Bignami. non esiste più allora (per l'avvenuta combinazione) emolisina libera nel siero, e quindi falliscono i tentativi di dimostrarla *in vitro*.

Questo ragionamento può essere applicabile ad altre emoglobinemie, e costituisce una delle ragioni per cui le isolisine umane, pure esistendo, non possono sempre essere dimostrate sperimentalmente. E vi sono anche altri fatti che possono spiegare le controversie a cui hanno dato luogo le ricerche sulle emolisine umane. Secondo Ehrlich un siero normale può possedere più lisine specifiche per globuli rossi di animali di specie diversa, ed il siero umano non sfuggirebbe a questa legge, come hanno anche dimostrato le ricerche di Neisser e Döring (64). Inoltre Ascoli M. (68) ed io abbiamo veduto che il potere globulicida, come quello agglutinante, può variare di fronte a globuli rossi umani provenienti da individui diversi. Da ultimo non è escluso che nel siero umano possano riscontrarsi e prodursi, in speciali circostanze, antiemolisine (108). Per tutti questi motivi si comprende come i risultati delle esperienze sul siero umano possano essere discordanti.

Su di un solo punto per ora si può convenire, che cioè le isolisine esistono, ma che la loro dimostrazione non è sempre possibile. È necessario anche qui, come per le agglutinine, che i globuli rossi, adoperati nel saggio, posseggano eventualmente gruppi combinabili con quelli del siero. Secondo alcuni autori, ammesso che nel siero umano possa in alcuni casi trovarsi il solo anticorpo emolitico, sarebbe possibile trovare ad esso un complemento nel siero di animali (Eisenberg l. c., Hahn e Tromsdorff 109), ciò che è riuscito impossibile ad altri (110). Infatti anche il complemento deve trovare il suo gruppo combinabile nel ricettore, che in ogni caso non è identico.

La distinzione delle lisine dalle agglutinine è ammessa comunemente, dopo Ehrlich e Morgenroth, da quasi tutti gli osservatori. Solamente il Baumgarten (111) sostiene che la termolabilità di sostanze che si distruggeno a 55° C, non dimostra che esse agiscano chimicamente provocando l'emolisi.

A 55°, secondo l'A. viene ad essere modificata la tensione osmotica del siero, per modo che i globuli si disciolgono. Egli attribuisce alle agglutinine nell'emolisi una grande importanza. Queste sostanze porrebbero i globuli rossi in condizioni tali, che anche un lieve grado di anisotonia può determinarne la dissoluzione. Egli stabilisce la legge che le agglutinine coincidano con il corpo immune di Ehrlich (sensibilizzatrice). Le ipotesi di Baumgarten sono state molto combattute da altri (112). Secondo Wassermann (97) l'agglutinina e l'ambocettore potrebbero avere un unico gruppo aptoforo in comune, la presenza del complemento determinerebbe la formazione della lisina, la sua assenza l'azione della sola agglutinina.

Tuttavia da successive indagini egli conclude che agglutinina e anticorpo, almeno nel piocianeo, sono due sostanze perfettamente differenti, le quali *non* hanno nemmeno in comune il gruppo aptoforo; e, per conseguenza, nella pratica, il saggio dell'agglutinazione e quello dell'immunità (Pfeiffer l. c.) debbono considerarsi due reazioni ben distinte.

Nel siero umano, dopo quanto si è detto, una perfetta distinzione fra le isoagglutinine e le isolisine non è rigorosamente dimostrata. Si è veduto spessissimo chè il siero era fornito di spiccato potere agglutinante e non emolitico, ma non è accaduto mai nè a me, nè, che io sappia, ad altri, di riscontrare nell'uomo un siero isolitico e nello stesso tempo sprovvisto di ogni potere isoagglutinante.

Da tutto ciò si deduce che il siero del sangue umano può contenere isolisine, e che la dimostrazione *in vitro* di tali sostanze è di rado possibile. Tale difficoltà può essere spiegata tenendo conto della origine delle lisine secondo la dottrina di Ehrlich. Data la specificità che queste sostanze presentano di fronte a globuli rossi provenienti da certuni individui sani piuttosto che da altri, può forse ammettersi, in base alla dottrina di Ehrlich, che esistano gruppi o stipiti di eritrociti umani fra loro ben differenziati dal fatto che un dato siero trova in essi gruppi corrispondenti combinabili, o no, con le proprie isoagglutinine ed isolisine (1).

Influenza della milza sulla produzione delle emoagglutinine e delle emolisine.

Una questione molto importante è quella della *sede d'origine delle agglutinine e delle lisine*. La dottrina di Ehrlich può spiegare il meccanismo col quale tali sostanze sono generate dalle cellule: quella di Metchnikoff e dei suoi scolari attribuisce la loro produzione ai leucociti. Ma è ancora discusso se vi sia un organo speciale in cui risieda maggiormente od esclusivamente il lavorìo di formazione di tali sostanze elaborate dall'organismo spesso, ma non sempre, per la propria difesa contro elementi cellulari estranei, e

---

(1) Nel malato (n. 10, tabella II) affetto da anemia grave primaria, che non presentò mai potere isoagglutinante e isolitico, il collega dott. Ugolini intraprese, a scopo terapeutico, iniezioni intramuscolari di sangue umano normale. Dopo iniezione di circa 70 cmc. di sangue, il siero di tale malato non presentava nè potere agglutinante, nè potere emolitico sugli eritrociti dell'individuo che aveva fornito il sangue. L'esperienza fu sospesa per indocilità dell'infermo.

talora anche contro i propri (autoagglutinine, autolisine). L'ingrandimento che subisce la milza nelle infezioni, e quello anche più notevole che presenta in malattie nelle quali ha luogo un intenso processo di distruzione di eritrociti, hanno fatto supporre a molti autori che quest'organo abbia una parte importante nella formazione degli anticorpi in genere. I risultati degli esperimenti per quello che riguarda le infezioni bacteriche non sono concordi (113). Riguardo alle agglutinine, Jatta (114) ha veduto che, due o tre giorni dopo l'inoculazione del bacillo del tifo, il potere agglutinante è notevolmente più forte nella milza che nel siero. In seguito il potere agglutinante del siero è più grande. Per l'emolisi è comunemente ritenuto che la milza sia non solamente un organo ematopoietico, ma anche ematolitico (115). In una recente comunicazione Harris ed Herzog (116) ammettono che l'aumentata distruzione degli eritrociti nel parenchima splenico, in casi di anemia splenica, debba farsi dipendere probabilmente da un enzima eritrolitico prodotto dalle cellule endoteliali della polpa splenica. Infatti la splenectomia è seguita costantemente da notevole miglioramento (19 casi, 14 guarigioni). Coerentemente a questi risultati, Ascarelli (117) ha veduto che, nelle cavie trattate con sangue di coniglio, la milza contiene una notevole quantità di pigmento ematico, ed è ricca di emosiderina. Alcuni fatti clinici e sperimentali porterebbero dunque indirettamente ad ammettere l'importanza della milza nell'eritrolisi.

Mi è sembrato interessante di chiarire direttamente questo punto: se la milza abbia parte nella genesi del potere emoagglutinante ed emolitico *specifico* del siero. Come animali da esperimento ho scelto il coniglio e la cavia, nella quale la formazione di emoagglutinine e di emolisine specifiche, pel sangue di coniglio, è già stata accertata dalle prime e classiche ricerche di Bordet. Sedici cavie vennero preparate con iniezioni intraperitoneali di sangue defibrinato di coniglio. Poco prima che si cominciasse in tutte il suddetto trattamento, otto di esse furono smilzate. Un'altra cavia fu lasciata senza alcun trattamento, come controllo. Le iniezioni di sangue defibrinato vennero fatte progressivamente in ciascun animale a giorni alterni da 2, 3, 6, 12 cmc. per volta. Le cavie che raggiunsero la fine dell'esperienza furono sette: quattro smilzate e tre no. Ciascuna di esse aveva tollerato 70 cmc. circa di sangue di coniglio, senza notevole diminuzione del peso, e nessuna apparente modificazione della naturale vivacità. Il siero delle cavie così preparate; tanto di quelle previamente smilzate, quanto delle altre, era *nello*

istesso modo fortemente agglutinante, e discioglieva ugualmente con grande rapidità il sangue defibrinato di un coniglio di fresco ucciso. Il siero fornito dalla cavia di controllo non possedeva potere emolitico, ed era soltanto debolmente agglutinante.

Durante la preparazione vennero fatti vari saggi, aspirando in un tubicino capillare un poco di sangue da una vena dell'orecchio delle cavie, per vedere come si comportava il siero in riguardo al potere emoagglutinante ed emolitico. La prima prova fu fatta dopo che alle cavie erano stati iniettati circa 20 cmc. di sangue, ed allora le cavie vive in via di preparazione erano ancora dieci, delle quali sei splenectomizzate. Risultò che il siero non possedeva potere emolitico, ma era già manifestamente più agglutinante di quello dato dalla cavia di controllo. Il siero delle cavie smilzate era però *meno* agglutinante di quello fornito dalle altre, in quanto che non resisteva alla diluizione di 1 : 2-3, mentre l'altro siero agglutinava anche a 1 : 10-15. Tale marcata differenza si mantenne costantemente, quasi negli stessi limiti per ogni animale, in due saggi successivi fatti a cinque giorni di distanza l'uno dall'altro. In un ultimo saggio, fatto dopo 56 cmc. di sangue iniettato, era già visibile un discreto potere emolitico, indistintamente in tutti i sieri delle cavie preparate. Il potere agglutinante non diede il diverso comportamento di prima.

Quando l'emolisi avviene si è veduto, nei preparati microscopici, che i globuli rossi impallidiscono e tendono a diventare sferici, ma non aumentano di volume come quando vengono a contatto con acqua, o con una soluzione ipotonica. Questo fatto non depone in favore della teoria osmotica dell'emolisi sostenuta da Baumgarten (l. c.).

Nelle cavie smilzate, uccise alla fine della preparazione, non si trovò nulla che accennasse ad una riproduzione dell'organo.

Da queste esperienze risulta che la milza delle cavie non ha diretta influenza sulla produzione delle emolisine specifiche. La formazione delle emoagglutinine è diminuita in principio per la mancanza dell'organo, ma in seguito anche questo difetto viene compensato.

Tali risultati possono costituire un argomento in favore della teoria di Metchnikoff sull'origine delle alessine e degli anticorpi, specialmente se si tiene conto di quanto Kurloff (nel laboratorio di Ehrlich, 118) ha pubblicato sulla funzione della milza nelle cavie. Infatti se, secondo Metchnikoff, i fissatori e le citasi (rispettivamente gli anticorpi e i complementi) derivano dai leucociti, e se la

milza della cavia, secondo Kurloff, non ha importanza nella formazione dei globuli bianchi del sangue, quest'organo non dovrebbe pure avere alcuna influenza sulla produzione di quelle sostanze specifiche. E la deduzione teoretica è confermata dall'esperimento.

Conclusioni:

1. Il potere isoagglutinante del siero di sangue umano non può essere utilizzato a scopo di diagnosi nè nella malaria, nè in altre malattie.

2. Tale potere è dovuto all'esistenza, nel siero agglutinante, di una speciale sostanza (isoagglutinina) fissabile in parte dagli eritrociti agglutinabili.

3. Le isoagglutinine umane (forse molteplici in uno stesso siero) contengono certamente un gruppo combinabile, e un gruppo attivo non combinabile cogli eritrociti. La loro specificità di fronte a certi dati elementi è da ritenersi puramente accidentale.

4. L'agglutinazione in pile è distinta da quella vera in ammassi. Nell'una e nell'altra interviene l'attrazione molecolare (Bordet); ma mentre nella prima si tratta di un fatto fisico inerente alla primitiva natura dei corpi (siero, corpuscoli), nella seconda il fatto fisico non è che l'ultima conseguenza di altri fenomeni. Nell'aggruppamento a pile gli eritrociti hanno una parte passiva, nell'agglutinazione vera hanno invece una parte attiva, in quanto debbono fissare l'agglutinina. Nei fenomeni di autoagglutinazione entra certamente, come fattore importantissimo, una speciale alterazione dei globuli rossi.

5. Il siero di sangue umano può contenere isolisine, ma la dimostrazione in vitro di tali sostanze è stata sinora di rado possibile. Tale difficoltà può essere spiegata tenendo conto del modo di azione delle lisine, secondo la teoria di Ehrlich.

6. Una distinzione netta fra le isoagglutinine ed isolisine è, nell'uomo, probabile, ma non certa. Data la specificità che queste sostanze presentano di fronte a globuli rossi provenienti da certuni individui sani, piuttosto che da altri, può forse ammettersi, in base alla teoria di Ehrlich, che esistano stipiti di eritrociti umani fra loro ben differenziati dal fatto, che un dato siero trova in essi gruppi corrispondenti combinabili o no con le proprie isoagglutinine ed isolisine.

7. La milza, nella cavia, non ha diretta influenza sulla formazione delle emoagglutinine ed emolisine specifiche.

La produzione delle emoagglutinine è diminuita in principio per la mancanza dell'organo, ma in seguito questo difetto viene compensato.

Roma, 25 luglio 1903.

LETTERATURA.

1. Vedere principalmente: PFEIFFER. Zeits. f. Hyg. und Infect., Bd. XVI, XIX, XX — GALEOTTI. Sperimentale, 1900 — METCHNIKOFF. *L'immunité dans les maladies infectieuses*. Paris, Masson, 1901 — DUCLAUX. Traité de microbiologie — LUSTIG. Patologia generale. Milano, 1901 — Annales de l'Institut Pasteur, 1896-1901 — EHRLICH und MORGENROTH. Berliner klinische Woch., 1899-1901.
2. HILDEBRANDT. Virchow's Arch., vol. CXXXI.
3. KRAUS. Gesellschaft der Aerzte in Wien. 30 aprile 1897 e Wiener klin. Woch., agosto 1897. Inoltre: BORDET. Ann. de l'Inst. Pasteur, aprile 1899 — NOLF. Ibid., maggio 1900 — TCHISTOVITCH. Ibid., 1899, maggio.
4. BORDET. Annal. de l'Inst. Pasteur, marzo 1901.
5. BEHRING und KITASATO. Deutsche med. Woch, 1900.
6. WASSERMANN. Verhandl. des Kongres f. innere Medizin., 1900, aprile.
7. SCHÜTZE. Zeitschrift für Hygiene, Bd. XXXVI, 1901.
8. UHLENHUT. Deut. med. Woch., 1900, n. 46.
9. DEUTSCH. Vortrag gehalten in Pariser Aerztekongress, agosto 1900.
10. UHLENHUT. Deut. med. Woch., 1901, n. 6 e n. 30.
11. WASSERMANN und SCHÜTZE. Berlin. klin. Woch,. 1901, n. 7.
12. ZIEMKE. Deut. med. Woch., n. 26, 1901.
13. BORDET. Annal. de l'Inst. Past., 1899.
14. BUCHNER. Semaine médicale, 1894. Congresso di Budapest.
15. IDEM. Aerztlicher Verein in München, dicembre 1899.
16. EHRLICH. Klinisches Jahrbuch. VI. 1897. Berl. klin. Woch., 1898, n. 12 — Fortschritte der Med. 1897, 2 — *Toxine und Toxoide*. Real Encyclop. der gesam. Heilkunde. Vol. VII.
17. DUNGERN und LANDSTEINER. Centralb. für Bact. und Paras., 1899, pagina 549.
18. EHRLICH. *Schlussbetrachtungen*. Bd. VIII der Speciellen Pathologie und Therapie von Nothnagel (Separat Abdruck), Wien, 1901.
19. BORDET. Ann. de l'Inst. Past. 1896–1901.
20. IDEM. Ann. de l'Inst. Past., maggio 1901.

21. LANDOIS. Trattato di fisiologia. Milano, Vallardi, pag. 187.
22. BORDET. Ann. de l'Inst. Past., 1895, pag. 492.
23. IDEM. Ibid., aprile 1896.
24. GRUBER und DURHAM. Münch. med. Woch., n. 13, 1896 — GRUBER. Wiener klin. Woch., 1896. nn. 11 e 12.
25. VIDAL. Société méd. des Hôp., Paris, 26 giugno 1896.
26. VIDAL et SICARD. C. R. de la Société de Biolog., 30 gennaio 1897.
27. HAYEM. Société méd. des Hôp., Paris, 8 gennaio 1897.
28. PALTAUF. Wien. klin. Woch., 1897.
29. MALVOZ. Ann. de l'Inst. Past., 1897, pag. 583.
30. SALVIOLI. R. Accad. med. di Torino, 1898, nn. 1 e 2.
31. NIÇOLLE. Ann. de l'Inst. Past., marzo 1898.
32. DINEUR. Bulletin de l'Académie de méd. Belgique, 1898.
33. BELFANTI e CARBONE. R. Accad. med. di Torino, 1898, luglio.
34. BORDET. Ann. de l'Inst. Past., 1898, ottobre.
35. BUCHNER. Münch. med. Woch., 1892. C. R. de la Soc. de Biolog. 43, pag. 719.
36. BOSSAERT. Ann. de l'Inst. Past., 1898, dicembre.
37. EMMERICH und LÖW. Zeitschr. f. Hyg, ecc. Vol. XXXI — Vedi anche LÖW. Centralblatt f. Bact. und Paras., 1901, Bd. XXIX, pag. 681.
38. MÜLLER. P. T. Centralbl. f. Bact. u. Paras., 1901, XXX, n. 2.
39. BORDET. Ann. de l'Inst. Past., 1899, marzo.
40. IDEM. Ibidem., 1899, aprile.
41. LEVADITI. C. R. de la Société de Biolog., 29 luglio 1899.
42. SABRAZÈS et BRENGUES. Ibid., 1899, novembre.
43. LANDSTEINER. Centralb. für Bact. und Paras., 1900, Bd. XXVII, pag. 361.
44. MARAGLIANO. XI Congresso di medicina interna. Lipsia, 1892. V Congresso della Società italiana di medicina interna, ottobre 1892.
45. MALKOFF. Deutsche med. Woch., n. 14, 1900.
46. NOLF. Ann. de l'Inst. Past., maggio 1900.
47. BORDET. Ibid., maggio 1900.
48. GRÜNBAUM. B it. med. journ., 1900, pag. 1089.
49. SHATTOCK. Journ. of Path. and. Bact., vol. VI, 1900, pag. 303.
50. EHRLICH und MORGENROTH. Berlin. klin. Woch., 1900, n. 21.
51. DONATH. Wien. klin. Woch., 1900, n. 22.
52. HALBAN. Ibid. 1900, n. 24.
53. NEISSER. Deut. med. Woch., 6 dicembre 1900.
54. LO MONACO e PANICHI. Rend. Accademia Lincei, 2° semestre, serie 5ª, 1900.
55. FRIEDBERGER. Berlin. klin. Woch., n. 53, 1900.
56. JOOS. Zeitschr. f. Hyg. und Infect., 1901, Bd. 36, pag. 438. Centralbl. für Bact. und Paras., Bd. XXX, n. 23, 1901. Zeitschr. für Hyg. und Infect., Bd. XI, 1902, pag. 226.
57. KÖHLER. Klin. Jahrb., Bd. 8, H. 1, 1901 e Centralbl. für Bact. und Par., 1901, XXIX.
58. ASCOLI M. Bollett. della Società medico-chir. di Pavia. Seduta del 18 gennaio 1901.
59. CAMUS et PAGNIEZ. C. R. de la Soc. de Biol., 1901, pag. 242.
60. GABBI e NADALÀ. Gazz. degli Osped. e delle Cliniche. aprile 1901 (citati da MARAGLIANO).

61. Schütze und Scheller. Zeitschr. für Hyg., XXXVI, pag. 270.
62. Bongiovanni. Riforma medica, maggio 1901.
63. Grixoni. Gazzetta degli Osped. e delle Cliniche, 1901, n. 57 e n. 138.
64. Neisser und Döring. Berl. klin. Woch., 1901, n. 22.
65. Mircoli. Gazzetta degli Osped. e delle Cliniche, 23 giugno 1901 (citato da Maragliano).
66. Mertens. Deuts. med. Woch., 1901, n. 24.
67. Policlinico, Sezione pratica, 13 luglio 1901.
68. Ascoli M. Bollettino della Soc. med.-chir. di Pavia, 5 luglio 1901.
69. Novi e Meruzzi. Policlinico, Supplemento settimanale, 20 luglio 1901.
70. Ascoli M. e Riva. Münch. med. Woch., 20 agosto 1901.
71. Harrison. Centralbl. für Bact. und Paras., 1901, XXX, pag. 115.
72. Castellani. Zeitschr. für Hyg. und Infect., 1901, XXXVII, pag. 391.
73. Pace. Rivista critica di clinica medica, 1901, nn. 38-40.
74. Eisenberg. Wien. klin. Woch., 1901, n. 42.
75. Landsteiner. Wien. klin. Woch., 1901, n. 46, e Centralblatt für Bact. und Paras., Bd. XXXII, n. 19 (autoreferato).
76. Asakawa. Centralbl. für. Bact. und Paras., Bd. XXXI, n. 7.
77. Resinelli. Società medico-chir. di Ferrara, 28 novembre 1901.
78. Altobelli e Memmo. Giornale medico del R. esercito, gennaio 1902.
79. Landsteiner und Sturli. Wien. klin. Woch., n. 2, 1902.
80. Kraus und Ludwig. Wien. klin. Woch., 1902, n. 5.
81. Lo Monaco e Panichi. Riforma medica, 1902, nn. 33-35.
82. Capogrossi. Riforma medica, 1902, n. 82.
83. Halban e Landsteiner. Münch. med. Woch., 1902, n. 12.
84. Klein. Wien. klin. Woch., 1902, n. 16, 1903, nn. 5, 6.
85. Pick. Hofmeisters Beiträge zur Chem. Phys. und Path., Bd. 1, 1902.
86. Camus et Pagnier. Semaine médicale, 1902, 21 maggio.
87. Bezzola. Riforma medica, 1902, n. 192.
88. Nicolle et Trenel. Ann. de l'Inst. Past., 1902, agosto.
89. Neufeld. Centralbl. für Bact. und Paras., Bd. XXXI, 1902, nn. 21, 22.
90. Jehle. Wien. klin. Woch., 1902, n. 20.
91. Landsteiner. Münch. med. Woch., 1902, n. 46.
92. Halsey. Centralbl. für Bact. und Paras., Bd. XXXIII, nn. 9, 10, 1903.
93. Noguchi. Citato Gazzetta degli Osp. e delle Clin., 1903, n. 61.
94. Biffi. Questi Annali, 1903, fascic. II.
95. Bail. Prager med. Woch., 1901.
96. Eisenberg und Volk. Zeitschr. für Hyg. und Infect., Bd. XL, Heft. 1.
97. Wassermann. Ibid., Bd. XLII, H. 2, 1903.
98. Ford. Ibid., 1902, Bd. XV, pag. 363.
99. Lauder Brunton. Jour. of Path. and Bact., vol. VII, 1901, pag. 53.
100. Gilardoni. Gazzetta degli Osp. e delle cliniche, n. 44, 1903.
101. Citato da Gruber. Centralbl. für Bact. und Paras., 1900, XXVII.
102. Salvioli. R. Acc. med. di Torino, febbraio, marzo 1899.
103. Myers. Centralbl. für Bact. und Paras., 1900, Bd. XXVIII, nn. 8, 9.
104. Hayem. *Du sang et de ses altérations anatomiques*, Paris, Masson, 1889.
105. Marchiafava e Bignami. *L'infezione malarica*. 1902, Milano, Vallardi.
106. Bignami. *Anatomia patologica delle perniciose*. Atti Acc. med. di Roma, 1890.

107. MARCHIAFAVA e BIGNAMI. *Malaria*. William Wood. New York (Aggiunta del 1902).
108. DUNBAR. Münch. med. Woch., n. 44, 1902.
109. HAHN und TROMSDORFF. Ibid., 1902, n. 35.
110. CELLI, CARDUCCI e CASAGRANDI. Atti della Società per la malaria. Volume III, 1902.
111. BAUMGARTEN. Verhandl. der Deut. Path. Gesell. Vierte Tag. 1902.
112. ASCOLI G. Bollettino dell'Acc. med. di Genova, anno XVII, n. 5.
113. TIZZONI e CATTANI. Centralbl. für Bact. und Paras., Bd. XI — BARDACH. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1890. — SUDAKEVITCH. Ann. de l'Inst. Past., 1891 — KURLOFF, WRATCH. Novembre 1888.
114. JATTA. Zeitschr. für Hyg. und Infect., 1900.
115. LUCIANI. *Fisiologia dell'uomo*. Milano, Società Ed. Libr., 1901.
116. HARRIS and HERZOG. Trans. of the Chicago Patologic. Society, volume IV.
117. ASCARELLI. Policlinico, vol. VIII, 1901.
118. EHRLICH und LAZARUS. Specielle Path. und Therap. v. Nothnagel. Wien, 1898.

Istituto d'igiene della R. Università di Roma

Ricerche sulle agglutinine del tifo

per i Dott. D. De Blasi e L. DE BERARDINIS.

L'agglutinazione dei batteri è da circa un decennio argomento di svariate e minuziose ricerche, dalle quali è già scaturita molta luce sulla maniera, con cui il fenomeno si svolge, e sulle proprietà delle sostanze che concorrono a produrlo. Tuttavia parecchie questioni restano ancora aperte, le quali, se pur non hanno diretta attinenza coll'applicazione del fenomeno alla pratica, possono però offrire il modo di intenderne meglio il significato e di spiegarne alcune particolarità apparentemente contraddittorie. Alcuni aspetti di tali questioni sono stati l'oggetto di queste ricerche, nelle quali, come materia di studio, fu scelto il b. del tifo e fu tenuta la seguente

Tecnica.

Il b. del tifo adoperato appartiene ad uno stipite di non grandissima virulenza, ma in compenso fortemente agglutinabile: la possibilità di questo rapporto inverso fra virulenza ed agglutinabilità non è un fatto nuovo, giacchè lo Pfeiffer osservò che i vibrioni del colera assai virulenti sono meno intensamente agglutinabili dei vibrioni poco virulenti.

Le prove di agglutinazione furono eseguite con brodocolture e con siero di cavie immunizzate in diverse maniere, come sarà detto in seguito. Le miscele furono fatte in tubetti di vetro del diametro interno di circa mm. 6, e per tutte le prove fu tenuta costante ed uguale ad un centimetro cubo la quantità di cultura; sicchè, per ottenere i diversi rapporti, si aggiungevano nei diversi tubicini quantità varie di siero.

Il metodo seguito per ottenere le diverse diluzioni fu quello proposto dal Widal (1).

In ogni esperienza furono costantemente saggiati i seguenti rapporti: 1:10; 1:25; 1:50; 1:100; 1:250; 1:500; 1:1000.

---

(1) Annales de l'Inst. Pasteur, 1897.

Non occorreva pel nostro scopo ottenere sieri fortemente agglutinanti. e perciò non solo non furono istituite prove con diluizioni maggiori, ma l'immunizzazione delle cavie non venne mai spinta oltre quel certo grado, che si stimava bastevole.

Le miscele si tenevano in termostato a 37° C. per 6 h., e l'osservazione, sempre microscopica, si faceva ogni mezz'ora.

Le notazioni scelte per indicare i risultati furono le seguenti:

— mancanza del fenomeno;
± agglutinazione appena manifesta;
\+ id. netta;
++ id. forte;
+++ id. completa.

Furono sempre fatti, s'intende, i necessari controlli.

I.

Eliminazione delle sostanze agglutinogene dei corpi batterici.

È ormai bene assodato che nel siero normale degli animali esistono quantità più o meno grandi di sostanze capaci di agglutinare i batteri.

Il siero di un animale non trattato può agglutinare, in certe proporzioni, diverse forme batteriche A, B, C...; ma l'agglutinina capace di produrre il fenomeno con la forma A è, in generale, diversa da quella che lo produce con la forma B, e queste prime due sono alla lor volta diverse da quella che lo produce colla C, e via dicendo.

Tanto per addurre un esempio, il Wassermann potè separare le agglutinine normali antitifose dalle anticoleriche mediante il metodo di assorbimento di Ehrlich. Le agglutinine sono dunque in generale sostanze dotate di affinità specifica.

Esse inoltre, e questo è ancor più importante, esistono in gran quantità nel siero degli animali che sono in preda ad un'infezione batterica, o che l'hanno testè superata. Uno stesso animale è in grado di produrre contemporaneamente molte agglutinine distinte, come hanno constatato Malkoff (1) per quelle che agiscono sugli elementi istologici, Castellani (2) e Verney (3) per quelle che agiscono sui batteri.

(1) Deutsche medic. Wochenschrift, 1900.
(2) Zeitschrift f. Hygiene, 1902.
(3) Centralbl. f. Bakteriologie, 1902.

Le sostanze betteriche, che possiedono la proprietà di provocare nell'organismo la formazione delle agglutinine, sono molto probabilmente quelle stesse alle quali le agglutinine già formate si fissano per dare origine al fenomeno dell'agglutinazione visibile *in vitro*. Le sostanze agglutinogene quindi non sono altro che le sostanze agglutinabili, che la maggior parte degli autori tende ormai ad interpretare come catene laterali nel senso di Ehrlich. E poichè quegli aggruppamenti molecolari complessi, che denominiamo catene laterali, partecipano certamente in modo attivo al metabolismo del protoplasma vivo, è ovvio imaginare che possano essere trasformate, disgregate, rigenerate. Aggiungiamo inoltre che le tossine del b. difterico e del b. tetanico, le quali possono considerarsi come catene laterali dei corpi batterici, passano, inalterate o trasformate, nei liquidi delle brodocolture; e però era giustificato il supporre che anche le agglutinine potessero essere eliminate dal corpo batterico integre nella loro costituzione, o per lo meno tali da conservare le proprietà agglutinogene, qualora fossero introdotte in un organismo vivo. Questa supposizione poteva essere avvalorata in due modi: o facendo reagire il siero agglutinante specifico sul filtrato sterile delle culture, metodo diretto, già usato da Kraus (1), e Paltauf (2), e dai fautori delle loro ipotesi; o inoculando il filtrato sterile delle colture negli animali, per vedere se in questi si producessero in quantità rilevanti agglutinine specifiche, metodo indiretto, seguito da Levy e Bruns (3), Rodella (4) ed altri sperimentatori.

Questo secondo metodo fu seguito nelle esperienze che saranno qui sotto riassunte.

Furono adoperate a tale scopo colture in brodo del b. del tifo tenute 50 giorni a 37° C. A bella posta furono preferite le colture vecchie alle giovani, movendo dalla conoscenza del fatto che i germi esistenti nelle prime sono in generale meno agglutinabili di quelli delle seconde, e supponendo che la diminuita agglutinabilità potesse dipendere dalla eliminazione dei recettori agglutinabili subìta dai corpi batterici.

La brodocoltura fu fatta passare attraverso un doppio filtro di carta, previamente sterilizzato, e il liquido raccolto venne diviso in due parti, una delle quali fu filtrata attraverso una comune candela nuova di Berkefeld.

(1) Wiener klin. Wochenschrift, 1897.
(2) Ivi.
(3) Berliner klin. Wochenschrift, 1897.
(4) Centralbl. f. Bakteriologie, 1900.

Di questo secondo filtrato si fecero sempre i controlli colturali, che rimasero costantemente negativi. I corpi batterici raccolti sul filtro di carta e quelli raccolti attorno alle pareti della candela furono mescolati ed emulsionati in soluzione di NaCl al 0. 85 per cento.

Si ebbero così pronti tre diversi materiali, con ciascuno dei quali furono inoculate tre cavie, per tre volte, con intervalli di tre giorni.

Col siero di ciascuna fu eseguita la reazione agglutinante.

Eccone i risultati:

TABELLA I.

Filtrato alla carta di brodocolture di giorni 50, inoculato ciascuna volta alla dose di cmc. 0. 50:

Cavia n. 1 di gm. 290, sacrificata un giorno dopo la 3ª inoculazione	$A_2 = 1:250$
Cavia n. 2 di gm. 290, sacrificata un giorno dopo la 3ª inoculazione	$A_2 = 1:100$
Cavia n. 3 (morta prima della 3ª inoculazione).	

TABELLA II.

Filtrato alla carta e alla candela di brodocolture di giorni 50, inoculato ciascuna volta alla dose di cmc. 1:

Cavia n. 1 di gm. 245, sacrificata 5 giorni dopo la 3ª inoculazione	$A_2 = 1:25$
Cavia n. 2 di gm. 290, sacrificata un giorno dopo la 3° inoculazione	$A_2 = 1:50$
Cavia n. 3 di gm. 330, sacrificata 5 giorni dopo la 3ª inoculazione	$A_2 = 0$

TABELLA III.

Emulsione dei corpi batterici residui delle brodocolture, inoculata ciascuna volta alla dose di cmc. 0. 50:

Cavia n. 1 di gm. 275, sacrificata 11 giorni dopo la 3ª inoculazione	$A_2 = 0$; $A_6 = 1:100$
Cavia n. 2 di gm. 285, sacrificata 11 giorni dopo la 3ª inoculazione	$A_2 = 0$; $A_6 = 1:500$
Cavia n. 3 (morta prima della 3ª inoculazione).	

Dal confronto tra la 1ª e la 3ª tabella non risulta alcuna differenza notevole, salvo che il fenomeno compare tardivamente nelle prove della 3ª serie; ma, paragonando i risultati della 2ª tabella con quelli delle altre due, si vede che il potere agglutinante del siero delle cavie inoculate col filtrato sterile è manifestamente minore di

quello che presentano le altre cavie. Se poi si guarda al più debole rapporto nel quale il fenomeno è visibile (1 : 25) e se si pensa che l'agglutinazione in questo rapporto può essere data da sieri normali, resta il dubbio che nel caso presente il fenomeno osservato sia dovuto alle agglutinine normali, piuttosto che ad una piccola quantità di agglutinine prodotte sperimentalmente. Si potrebbe obbiettare che nel liquido colturale fossero bensì presenti gli agglutinogeni, ma siano stati trattenuti dal filtro siliceo. L'obbiezione non è priva di fondamento, perchè non mancano osservazioni al riguardo; ma cade di fronte ad alcuni risultati, che saranno esposti in seguito.

Intanto da queste prime esperienze si può concludere che i corpi batterici delle brodocolture vecchie ritengono in sè i recettori agglutinabili, e che *il filtrato di esse o non contiene sostanze agglutinogene, o ne contiene in scarsissima quantità.*

Recentemente Neisser e Shiga (1) hanno indicato un metodo abbastanza semplice per separare i recettori agglutinogeni dei corpi batterici. Essi consigliano di emulsionare delle patine da agar in soluzione di NaCl al 0.85 $^{\circ}/_{\circ}$, di tenere l'emulsione prima per $^{1}/_{2}$ h. a 70° C. e poi per tre giorni a 37°, e finalmente di filtrarla attraverso una candela di Berkefeld; si ottiene così un liquido sterile, che iniettato negli animali provoca la formazione di agglutinine specifiche e perciò contiene moltissimi agglutinogeni. Non si sa per quale meccanismo l'azione del NaCl e della temperatura di 70° C. operino il distacco dei recettori agglutinabili; ma il fatto è in ogni modo bene accertato e si ripete in ogni esperienza.

La memoria di Neisser e Shiga comparve quando già erano state eseguite le esposte esperienze con le brodocolture. Fu precedentemente accennato alla obbiezione che poteva esser mossa contro quei risultati: il metodo di Neisser e Shiga offriva il mezzo di stabilire quale valore dovesse attribuirsi a questa obbiezione. Infatti, se è vero che il siero ottenuto con le inoculazioni del filtrato della emulsione batterica presenta un forte potere agglutinante, bisogna ammettere che il filtro non trattiene gli agglutinogeni o ne trattiene solo una scarsa quantità.

Per avere una serie di esperienze parallele a quelle fatte con le brodocolture, si pensò di raccogliere anche qui i corpi batterici rimasti sul filtro di carta e attorno alle pareti del filtro siliceo e di farne una emulsione in acqua distillata. Una prima serie di cavie fu inoculata col filtrato della emulsione dell'agarcultura di 24 h.,

(1) Deutsche medic. Wochenschrift, 1903.

una seconda serie col filtrato dell'emulsione dell'agarcultura di 72 h., e una terza coll'emulsione dei corpi batterici residui. Essendo superflùo riferire minutamente i risultati delle prove di agglutinazione in ogni singolo caso, essi vengono sinotticamente riassunti nelle seguenti tre tabelle, nelle quali A_2 significa agglutinazione netta osservata dopo due ore:

TABELLA IV.

Agarcoltura di 24 h. emulsionata in soluz. di NaCl al 0.85 %. Riscaldata ½ h. a 70 ° C., poi tenuta tre giorni a 37 C. e *filtrata alla carta e alla candela.* Inoculata in quantità di 1 cmc. per tre volte con l'intervallo di tre giorni:

Cavia N. 1	di grm.	290	$A_2 = 1 : 250$
» » 2	»	290	$A_2 = 1 : 1000$
» » 3	»	265	$A_2 = 1 : 500$
» » 4	»	300	$A_2 = 1 : 1000$
» » 5	»	800 (inocul. con cmc. 2)	$A_2 = 1 : 1000$
» » 6	»	720 (» » » 2)	$A_2 = 1 : 1000$
» » 7	»	730 (» » » 2)	$A_2 = 1 : 500$

TABELLA V.

Agarcoltura di 72 h. trattata come sopra. Inoculata in quantità di cmc. 2 per tre volte con intervalli di tre giorni:

Cavia N. 1	di grm.	680	$A_2 = 1 : 500$
» » 2	»	630	$A_2 = 1 : 500$
» » 3	»	460	$A_2 = 1 : 500$
» » 4	»	520	$A_2 = 1 : 250$
» » 5	»	550	$A_2 = 1 : 250$
» » 6	»	440	$A_2 = 1 : 500$

TABELLA VI.

Emulsione dei corpi batterici residui dell'agarcoltura emulsionati in acqua distillata. Inoculata in quantità di cmc. 1:

Cavia N. 1	di grm.	660	$A_2 = 1 : 100$
» » 2	»	640	$A_2 = 1 : 250$
» » 3	»	495	$A_2 = 1 : 250$
» » 4	»	810	$A_2 = 1 : 100$
» » 5	»	750	$A_2 = 1 : 250$

Si vede chiaramente da queste tabelle:

1° che i sieri degli animali inoculati con colture, le quali furono emulsionate e riscaldate a 70° C. in eta di 24 h., presentano un potere agglutinante maggiore dei sieri degli animali inoculati con agarculture, che subirono lo stesso trattamento in età di 72 h.;

2° che i sieri delle cavie inoculate col filtrato hanno un potere agglutinante che oscilla fra $A_2 = 1:500$ e $A_2 = 1:1000$, mentre i sieri delle cavie inoculate con l'emulsione dei corpi batterici residui non mostrano mai un potere agglutinante superiore ad $A_2 = 1:250$.

Da questi risultati non solo resta confermata l'osservazione di Neisser e Shiga, che cioè i recettori agglutinabili passano nella soluzione di NaCl e possono quindi provocare la produzione di grandi quantità di agglutinine; ma si rileva anche che, col procedimento di questi autori, vien resa libera la maggior parte dei recettori agglutinabili: i corpi batterici residui infatti ne posseggono solo tanti da non provocare nel siero dell'animale inoculato un potere agglutinante superiore ad $A_2 = 1:250$.

Paragonando ora questi risultati con quelli ottenuti in base alle esperienze con le brodocolture, appare manifesto che i recettori agglutinabili del bacillo del tifo possono bensì essere distaccati, per così dire, violentemente e in gran numero dal nucleo funzionale del corpo batterico, mediante il processo sopra menzionato, *ma in condizioni colturali normali o non vengono eliminati nel liquido nutritivo, o vengono eliminati soltanto in numero esiguo, tanto da essere incapaci di provocare nell'organismo la produzione di quantità nettamente apprezzabili di agglutinine.*

II.

Trasformazioni inattive delle agglutinine.

Già Ehrlich aveva stabilito una netta distinzione fra aptine complesse — citotossine in genere, caratterizzate, fra l'altro, dal loro inattivamento per opera del calore e dal riattivamento con l'aggiunta di siero fresco — e aptine semplici, suscettive anch'esse di venire inattivate col calore, ma incapaci di essere riattivate. Alle sostanze di questa seconda specie apparterrebbero i recettori del secondo ordine, una volta resi liberi dal corpo cellulare: agglutinine, precipitine.

Le agglutinine, riscaldate per un'ora a 70°-75° C. perdono in generale la proprietà di dare origine all'agglutinazione manifesta, ed O. Bail (1) interpetra questo fatto ammettendo che quel grado di temperatura trasformi in modificazione biologicamente inattiva, o, di-

(1) Archiv für Hygiene, 1902.

ciamo pure, distrugga — parola inesatta, che tuttavia adotteremo per brevità — il complemento agglutinante; quindi, secondo lui, le agglutinine avrebbero costituzione analoga alle emolisine, e risulterebbero composte di un ambocettore, l'agglutinoforo e di un complemento, l'emiagglutinina.

Le agglutinine così inattivate non sono riattivabili coll'aggiunta di siero fresco normale, nello stesso modo col quale si riattivano le citotossine. Ma ciò per O. Bail denota semplicemente che l'emiagglutinina non esiste normalmente nel siero di sangue; anch'essa però sarebbe prodotta *ex novo* per effetto dell'azione degli agglutinogeni batterici. Infatti, secondo il Bail, se da un lato si osserva la reazione agglutinante di siero specifico inattivato col calore e poi riattivato mediante l'aggiunta di una piccola quantità dello stesso siero non riscaldato, e dall'altro lato la reazione fatta con siero non riscaldato, si vede che nella prima prova il fenomeno è di gran lunga più manifesto che nella seconda. Ciò denoterebbe la presenza, nel siero agglutinante, di un eccesso di emiagglutinina, atta a riattivare l'agglutinoide presente ancora nel siero riscaldato.

L'esperienza del Bail è certo ingegnosa, tuttavia non è di quelle che valgono a togliere ogni dubbio.

Nell'autunno del 1902 accadde ad uno di noi (De Blasi) di saggiare il potere agglutinante di due esemplari di siero che provenivano da persone sospette di tifo. L'esame fu fatto due giorni dopo la presa del sangue.

Ecco il risultato della reazione osservata macroscopicamente:

	1:10	1:25	1:50	1:80	1:100
1° caso A_2 =	±	+	+	±	—
2° » A_2 =	—	±	+	+	±

Il comportamento paradossale di questi due sieri non può essere spiegato nel senso di un semplice inattivamento parziale di agglutinine, perchè in questo caso il fenomeno sarebbe dovuto comparire nel rapporto di 1:10 con intensità maggiore che negli altri rapporti.

Accettando il concetto del Bail sulla costituzione delle agglutinine, il fenomeno potrebbe trovare la sua spiegazione nella ipotesi del così detto « storno dei complementi », ipotesi fondata da Neisser e Wechsberg (1) sull'osservazione di fatti analoghi a quello di cui ci occupiamo. Questa spiegazione acquisterebbe dunque un'importanza generale.

(1) Münchener medic. Wochenschrift, 1901.

I fatti su cui si fondano Neisser e Wechsberg sono questi: eseguendo le reazioni in diversi rapporti fra elementi cellulari (istologici o batterici) e sieri contenenti delle aptine complesse, cioè costituite da ambocettori e da complementi, si può osservare che il fenomeno, nettissimo nei rapporti medi, resta negativo o si manifesta solo assai debolmente nei rapporti bassi ed alti.

La spiegazione che di questi fatti hanno dato Neisser e Wechsberg è molto chiara.

Premettiamo che la quantità degli ambocettori presenti nei sieri può essere esuberante rispetto a quella dei complementi. È quanto aveva notato Dungern (1) ed hanno confermato Lipstein (2) ed altri autori. Questa condizione si realizzerebbe costantemente nei sieri che presentano il fenomeno paradosso.

Premettiamo inoltre che gli ambocettori, unendosi ai batteri, perderebbero una parte della loro affinità verso i complementi.

Facendo uso del siero a concentrazioni medie, la quantità degli ambocettori è tale, che essi si uniscono tutti ai batteri. I complementi essendo in numero minore, non bastano per saturare tutti questi ambocettori; non pertanto bastano per produrre il fenomeno della lisi o della battericidia.

A concentrazioni forti, la quantità degli ambocettori diviene molto esuberante; quindi moltissimi ambocettori restano liberi. Siccome i complementi hanno un'affinità maggiore verso gli ambocettori liberi, si uniscono solo con questi, e non producono nè la lisi nè l'uccisione dei batteri.

Infine, a concentrazioni deboli tutti gli ambocettori si fissano ai batteri, e tutti i complementi agli ambocettori; ma la quantità degli uni e degli altri è troppo scarsa per produrre un'azione manifesta.

Dunque gli ambocettori che, a forti concentrazioni, restano liberi, *deviano* o, per così dire, *stornano* il complemento dagli ambocettori fissati ai batteri o agli elementi istologici.

Secondo noi questa potrebbe anche essere la spiegazione del comportamento dei due sieri umani rispetto all'agglutinazione del bacillo del tifo; salvo che nel nostro caso interverrebbero l'agglutinoide ed il complemento agglutinante invece dell'ambocettore e del complemento litico.

Eisenberg e Volk (3) osservarono sperimentalmente il fenomeno pa-

(1) Münchener med. Wochenschrift, 1900.
(2) Centralbl. f. Bakteriologie, 1902.
(3) Zeitschrift für Hygiene, 1902.

radosso dell'agglutinazione mancante nei rapporti bassi ed alti e presente nei rapporti medi; e, conforme al concetto di Ehrlich che le agglutinine fossero aptine semplici, vollero spiegare il fatto ammettendo la presenza di agglutinoidi, cioè di trasformazioni inattive delle agglutinine. Analogamente ai tossoidi derivati dalla tossina difterica, essi non possederebbero più l'azione specifica; conserverebbero però la proprietà di fissarsi agli stessi elementi a cui si fissano le agglutinine inalterate.

Per la spiegazione dei fatti finora noti la nostra ipotesi e quella di Eisenberg e Volk si reggono ugualmente, nè si ha ragione di dar la preferenza all'una piuttosto che all'altra; ma alcune osservazioni, che fra breve saranno riferite, fanno sorgere l'idea che le due ipotesi, pur contenendo parte del vero, non corrispondono pienamente ai fatti sperimentali.

Comunque, il fenomeno paradosso, per quanto noi sappiamo, era stato osservato solo in sieri vecchi prodotti sperimentalmente. Ora dalle due osservazioni fatte sul siero di sangue umano si può affermare *che esso può essere presente anche in sieri freschi.* Questo fatto ha molta importanza per la pratica siero-diagnostica, perchè serve a mettere in guardia contro la possibilità di errori nella determinazione quantitativa del potere agglutinante.

III.

Pluralità delle agglutinine.

Il fenomeno paradosso, si può provocare artificialmente, e fra i mezzi a tale scopo adoperati tiene il primato il cloroformio. Anzi lo Shiga (1) ha trovato che il cloroformio è capace di trasformare *quasi completamente* le agglutinine antidissenteriche in agglutinoidi, per modo che il siero perde la proprietà di agglutinare i batteri; ma per il b. del tifo questo fatto non è stato confermato dalle nostre esperienze, giacchè il siero agglutinante antitifoso, trattato con cloroformio per durate di tempo diverse, ha presentato bensì un comportamento importante sotto altro punto di vista, come sarà detto più oltre, ma ha conservato in generale il suo potere agglutinante.

(1) Deutsche med. Wochenschrift, 1903.

Trattando dunque con cloroformio il siero antitifoso non solo non si ottenne la trasformazione che si aspettava, conforme ai dati dello Shiga relativi al siero antidissenterico, ma si osservarono dei fatti degni di essere attentamente considerati. Sul principio, essendo i risultati delle mie esperienze assai diversi da quelli indicati dallo Shiga, nacque il sospetto che la differenza dipendesse dalla durata di azione del cloroformio. Perciò questo fu sbattuto e tenuto a contatto del siero sia per qualche minuto, sia per qualche ora, sia anche per una intera giornata; ma i risultati ciò non ostante si mantennero costanti. Una volta per tutte dico qui che non furono mai trascurati i controlli, quantunque questi potessero sembrare superflui da poi che il Malvoz (1) aveva dimostrato che il cloroformio non esercita alcuna azione agglutinante sui b. del tifo. I sieri, sui quali fu fatto agire il cloroformio, furono ottenuti in diverse maniere e perciò verranno riuniti in diversi gruppi.

I GRUPPO. — Sieri ottenuti da grosse cavie trattate con tre inoculazioni di *brodocoltura virulenta* di 72 h. nella dose di cmc. 0. 15-0. 20 per volta. — Riproduco qui una tabella indicante il comportamento del siero di una di queste cavie:

1° subito dopo essere stato separato dal sangue;
2° due giorni dopo, senza alcun trattamento;
3° due giorni dopo, previo trattamento con cloroformio.

(1) Annales de l'Inst. Pasteur, 1897.

TABELLA VII.

Cavia n. 1, di gm. 650.

RAPPORTI	Siero fresco — ½ ora
1:10	+++
1:25	+++
1:50	+++
1:100.	+++
1:250.	+++
1:500.	+++
1:1000	+++

RAPPORTI	Siero di due giorni					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Sei ore	Mezz'ora	Un'ora	Sei ore
1:10	+++	+++	+++	—	±	±
1:25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:100.	+++	+++	+++	±	+++	+++
1:250.	—	—	+	—	+	+
1:500.	..	..	..	..	..	..
1:1000	..	..	..	..	..	..

Da questa tabella risulta: 1° che il potere agglutinante del siero, dopo due giorni, è già diminuito; 2° che il cloroformio ritarda e rende appena percettibile il fenomeno nel rapporto di 1: 10, mentre non lo modifica sensibilmente in nessuno degli altri rapporti.

II Gruppo. — Sieri ottenuti da cavie inoculate con *filtrato alla carta di brodocolture* di giorni 50.

Tabella VIII.

A) *Cavia n. 1, gm. 290, sacrificata 1 giorno dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero di due giorni					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora e mezza	Due ore	Mezz'ora	Un'ora e mezza	Due ore
1:10	—	—	±	—	—	—
1:25	—	+	++	—	+++	+++
1:50	—	±	+	—	+	++
1:100.	—	—	±	—	—	++
1:250.	—	—	—	—	—	±
1:500.	--	—	—	—	—	—
1:1000	—	—	—	—	—	—

B) *Cavia n. 2, gm. 290, sacrificata 1 giorno dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero di due giorni					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	—	—	+	—	—	±
1:25	—	—	+	—	±	++
1:50	—	—	+	—	+	+++
1:100.	—	—	±	—	—	±
1:250.	—	—	—	—	—	—
1:500	—	—	—	—	—	—
1:1000	—	—	—	—	—	—

Il fenomeno osservato nella cavia immunizzata con colture virulente si ripete anche in queste cavie più o meno nettamente; ma qui si osserva anche un altro fatto: nei rapporti medi il cloroformio affretta il fenomeno e lo rende più intenso.

III Gruppo. — Sieri ottenuti da cavie trattate con *filtrato alla carta e alla candela di Berkefeld* di brodocoltura di giorni 50.

TABELLA IX.

A) *Cavia n. 1, gm. 245, sacrificata 5 giorni dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1 : 10	—	+	+++	±	++	+++
1 : 25	—	±	±	—	±	+
1 : 50	—	—	—	—	—	+
1 : 100.	—	—	—	—	—	—
1 : 250.	—	—	—	—	—	—
1 : 500.	—	—	—	—	—	—
1 : 1000	—	—	—	—	—	—

B) *Cavia n. 2, gm. 290, sacrificata 1 giorno dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1 : 10	—	+	++	—	++	+++
1 : 25	—	±	±	—	+	++
1 : 50	—	—	—	—	—	+
1 : 100.	—	—	—	—	—	±
1 : 250.	—	—	—	—	—	—
1 : 500.	—	—	—	—	—	—
1 : 1000	—	—	—	—	—	—

Qui il cloroformio esercita un'unica azione: affretta e rende più evidente il fenomeno, anzi lo fa comparire là dove, senza il cloroformio, l'agglutinazione non sarebbe apprezzabile.

IV Gruppo. — Sieri ottenuti da cavie inoculate con *l'emulsione in acqua distillata dei corpi batterici* residui delle brodocolture.

Tabella X.

A) *Cavia n. 1, gm. 275, sacrificata 11 giorni dopo la 1ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Sei ore	Mezz'ora	Un'ora	Sei ore
1:10	—	—	+++	+++	+++	+++
1:25	—	—	+++	+	+++	+++
1:50	—	—	+++	—	+	+++
1:100.	—	—	+++	—	±	+++
1:250.	—	—	+++	—	—	++
1:500.	—	—	+++	—	—	—
1:1000	—	—	—	—	—	—

B) *Cavia n. 2, gm. 285, sacrificata 11 giorni dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Sei ore	Mezz'ora	Un'ora	Sei ore
1:10	—	—	+++	—	+	+++
1:25	—	—	+++	—	++	+++
1:50	—	—	+++	—	—	+++
1:100.	—	—	++	—	—	±
1:250.	—	—	—	—	—	—
1:500.	—	—	—	—	—	—
1:1000	—	—	—	—	—	—

In queste esperienze il cloroformio ha agito affrettando e rendendo più manifesto il fenomeno nei rapporti bassi e medi, e sopprimendolo o rendendolo appena percettibile nei rapporti alti.

Già da queste 4 tabelle si vede che, a seconda del modo diverso col quale si sono ottenuti i sieri agglutinanti, questi hanno subìta una diversa influenza da parte del cloroformio; il quale quindi può arrestare o ritardare il fenomeno semplicemente nei rapporti bassi o semplicemente nei rapporti alti; ovvero può affrettare e rendere più intensa l'agglutinazione sia nei rapporti medi soltanto, sia nei rapporti medi e bassi insieme, sia nei rapporti alti. È bene però fermare l'attenzione sul fatto che, in tanta varietà di risultati, questi si mantengono abbastanza costanti per ogni gruppo di sieri. Si potrebbe attribuire forse al brodo delle colture una certa influenza nella diversità dei risultati, ma questo dubbio scompare quando si pensa che nelle prove eseguite coi sieri dello stesso gruppo furono adoperati brodi diversi, e pure si ottennero dati concordi. La diversità del comportamento dei vari gruppi di sieri si spiega ammettendo che gli agglutinogeni ritenuti dai corpi batterici e quelli passati attraverso il filtro siano diversi, e che per conseguenza,

inoculati nell'organismo, diano origine ad agglutinine diverse, distinguibili per il loro diverso contegno rispetto al cloroformio.

V Gruppo. — Sieri ottenuti da cavie inoculate con filtrato alla carta e alla candela di emulsione di agarcolture di 72 h. in soluzione di NaCl al 0. 85 %.

Tabella XI.

Cavia A, di gm. 520, sacrificata un giorno dopo la 3ª iniezione.

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	—	—	—	—	—	—
1:25	—	±	+++	—	±	+++
1:50	—	±	+++	—	±	+++
1:100	—	—	+++	—	—	+++
1:250	—	—	+++	—	—	+++
1:500	—	—	—	—	—	—
1:1000	—	—	—	—	—	—

Cavia B, *di gm. 630, sacrificata un giorno dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	+	+	+	±	±	±
1:25	+	++	++	±	±	+
1:50	+	+	++	—	—	++
1:100.	—	±	++	—	—	++
1:250.	—	—	++	—	—	++
1:500. . . .	—	—	++	—	—	+
1 1000	—	—	±	—	—	—

Cavia C, *di gm. 380, sacrificata un giorno dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	—	+	+++	—	+++	+++
1:25	—	+	+++	—	+++	+++
1:50	—	++	+++	—	+++	+++
1:100.	—	++	+++	—	+++	+++
1:250.	—	—	+++	—	+	+++
1:500.	—	—	++	—	—	±
1:1000	—	—	—	—	—	—

Cavia D, di grammi 460, sacrificata 1 giorno dopo la 3ª iniezione.

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	+	+++	+++	+++	+++	+++
1:25	+++	+++	+++	++	+++	+++
1:50	++	+++	+++	+	+++	+++
1:100.	+	+++	+++	+	+++	+++
1:250.	±	+	+++	—	++	+++
1:500.	—	±	+++	—	±	++
1:1000	—	—	—	—	—	—

Su questi sieri si può dire che il cloroformio abbia influito poco o punto, ma importa notare che nel caso *A* il siero fresco presentava già per sè stesso il fenomeno paradosso, simile a quello presentato dai due sieri umani già ricordati.

VI Gruppo. — Sieri ottenuti da cavie inoculate con filtrato alla carta e alla candela di agarcolture di 24 h. emulsionate in soluzione di NaCl al 0. 85 %.

TABELLA XII.

Cavia A, di grammi 290, sacrificata 3 giorni dopo la 3ª iniezione.

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	+++	+++	+++	±	+++	+++
1:25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:100.	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:250.	++	+++	+++	+++	+++	+++
1:500.	+	+++	+++	+++	+++	+++
1:1000	—	±	±	±	+++	+++

Cavia B, di grammi 250, sacrificata 3 giorni dopo la 3ª iniezione.

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	++=	+++	+++	++	+++	+++
1:25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:100.	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:250.	±	+	+++	+	++	+++
1:500.	—	—	++	±	+	+++
1:1000	—	—	—	—	—	+++

In tutti questi sieri il cloroformio ha agito rendendo manifesto il fenomeno negli alti rapporti, là dove senza il cloroformio l'agglutinazione non era macroscopicamente visibile.

VII Gruppo. — Sieri ottenuti da cavie inoculate con emulsione in acqua distillata dei corpi batterici dell'agarcoltura di 72 h. riscaldata per 1/2 h. a 70° C.

Tabella XIII.

Cavia A, di gm. 810, sacrificata 3 giorni dopo la 3ª iniezione.

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	—	+	+++	—	+++	+++
1:25	—	+	+++	—	+++	+++
1:50	—	±	+++	—	±	++
1:100.	—	—	+++	—	—	±
1:250.	—	—	—	—	—	—
1:500.	—	—	—	—	—	—
1:1000	—	—	—	—	—	—

Cavia B, *di gm. 750, sacrificata 3 giorni dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	+++	+++	+++	++	+++	+++
1:25	++	+++	+++	++	+++	+++
1:50	±	++	+++	+	++	+++
1:100.	—	++	+++	—	±	+++
1:250.	—	—	+++	—	—	+++
1:500.	—	—	±	—	—	++
1:1000	—	—	—	—	—	—

Il comportamento di questi sieri rispetto al cloroformio è identico a quello delle tabelle precedenti.

VIII Gruppo. — Sieri ottenuti da cavie inoculate con emulsione in acqua distillata dei corpi batterici residui dell'agarcoltura, non riscaldata.

TABELLA XIV.

Cavia A, *di gm. 660, sacrificata 4 giorni dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero fresco					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	++	++	++	±	±	±
1:25	+	++	++	—	—	±
1:50	±	+	+	—	—	±
1:100.	—	±	±	—	—	—
1:250.	—	—	—	—	—	—
1:500.	—	—	—	—	—	—
1:1000	—	—	—	—	—	—

Cavia B, *di gm. 520, sacrificata 4 giorni dopo la 3ª iniezione.*

RAPPORTI	Siero fresco.					
	senza cloroformio			con cloroformio		
	Mezz'ora	Un'ora	Due ore	Mezz'ora	Un'ora	Due ore
1:10	—	—	+	—	—	—
1:25	—	+	++	—	±	+
1:50	—	++	+++	—	+	+++
1:100.	—	++	+++	—	+++	+++
1:250.	—	±	++	—	++	+++
1:500.	—	—	—	—	++	+++
1:1000	—	—	—	—	—	—

In queste due esperienze il cloroformio ha avuta una azione inibitrice su tutti i rapporti o solo sui rapporti bassi; in una di esse inoltre il fenomeno, per opera del cloroformio, è divenuto manifesto nei rapporti alti.

Dalle tabelle riportate appare dunque chiaro che *il cloroformio esercita sulle agglutinine del tifo un'azione, che varia secondo il modo col quale si è provocata nelle cavie la produzione delle agglutinine.*

Nel corso delle esperienze si è ripetuto con una certa frequenza questo singolare comportamento, che il cloroformio, mentre sopprime o ritarda la comparsa del fenomeno nei rapporti bassi, e talora anche nei rapporti alti, lo affretta e lo rende più manifesto nei rapporti medi. Siamo quindi di fronte ad una sostanza che, rispetto ad un fenomeno identico, si comporta in modo diverso, quasi antitetico, a seconda delle diverse proporzioni in cui reagiscono i due fattori principali che producono il fenomeno stesso. Se le agglutinine del tifo fossero sostanze uniche, non ci sapremmo spiegare questo fatto: perchè, sia ammettendo l'ipotesi dello storno dei complementi, sia ammettendo l'ipotesi della trasformazione in agglutinoidi, potremmo imaginare che il cloroformio agisce sulle agglutinine in modo da produrre l'una o l'altra delle due condizioni; ma con questo non ci spiegheremmo ancora perchè il cloroformio modifichi il comportamento *dello stesso siero* sempre *allo stesso modo*, qualunque sia la durata della sua azione, mentre con sieri ottenuti diversamente si comporta anche diversamente. Tutto si spiega invece, se si suppone che *le agglutinine del tifo non sono sostanze uniche.* Per renderci ragione dei fatti osservati basta ammettere nel siero la presenza di due specie di agglutinine, su ciascuna delle quali il cloroformio eserciti un'influenza diversa sopprimendo od ostacolando l'azione dell'una, affrettando e rafforzando l'azione dell'altra.

Quando ad un siero, che normalmente agglutina in tutti i rapporti il bacillo del tifo, si aggiunge del cloroformio, e si osserva che nei rapporti bassi l'agglutinazione non avviene più, mentre si manifesta assai intensamente negli altri rapporti, bisogna convenire che il cloroformio ha distrutto o, se si vuole, semplicemente attaccata, una specie di agglutinine, e precisamente quella che ha la massima affinità pei corpi batterici e che, si noti bene, affinchè si produca il fenomeno paradosso deve esistere in quantità piccola relativamente all'altra specie di agglutinina. Nei rapporti medi allora i batteri vengono saturati quasi completamente dalla modificazione inattiva della prima specie, *che ha per essi maggiore avidità*, e quindi non possono essere fissati ed agglutinati dall'altra specie di aggluti-

nina, rimasta attiva. Negli altri rapporti invece, essendo minime le quantità di agglutinine totali, sarà relativamente assai minore la quantità delle modificazioni inattive della prima specie; perciò occuperanno minor numero di recettori batterici, e lasceranno il posto alle agglutinine attive, che potranno produrre il fenomeno manifesto dell'agglutinazione.

Come fu detto prima, parecchie volte il cloroformio ha soppresso o ritardato il fenomeno anche nei rapporti alti: per spiegare questo fatto non ci sarebbe, a dir vero, bisogno di ricorrere all'ipotesi dell'esistenza di una terza specie di agglutinine, giacchè basterebbe ammettere che il cloroformio distrugge o trasforma una parte delle agglutinine totali. Ma possiamo sempre domandarci perchè mai solo una parte di esse venga distrutta, dal momento che sono tutte simili tra loro: vi devono essere in questa porzione di agglutinine, che sono attaccate dal cloroformio, delle cause che le rendono più vulnerabili delle altre; il che basterebbe a giustificare almeno il sospetto della *possibile esistenza di una terza specie agglutinine*. In ogni modo, lasciando da parte quest'ultima considerazione, i risultati delle molteplici esperienze eseguite e la discussione fattane autorizzano ad ammettere *che nel siero antitifoso esistono almeno due specie di agglutinine, che si distinguono l'una dall'altra per due caratteri essenziali:*

1° *Agglutinine facilmente attaccabili dal cloroformio e fornite della massima affinità pei corpi batterici: si possono chiamare protoagglutinine;*

2° *Agglutinine agevolate nella loro azione dal cloroformio ed aventi minore affinità pei corpi batterici: deuteroagglutinine.*

Lo Joos (1) per altra via è pervenuto a conclusioni analoghe a queste. Avendo egli riconosciuta una differenza di comportamento delle sostanze agglutinogene rispetto al calore, ammise due specie di agglutinogeni: uno, α-agglutinogeno, rapidamente distruttibile a 60-62° C.; l'altro, β-agglutinogeno, resistente all'azione del calore. A ciascuna di queste due specie di agglutinogeni corrisponderebbero due specie di agglutinine; una α-agglutinina ed una β-agglutinina, distinguibili fra loro per una certa affinità elettiva verso gli agglutinogeni omonimi. Manca un termine di paragone per potere, anche lontanamente, stabilire quali relazioni corrano fra le due specie di agglutinine ammesse dallo Joos e quelle da noi trovate. Recentemente anche il Verney (2) fondandosi su considerazioni d'indole

(1) Centralblatt für Bakteriologie, 1903.
(2) Revue gén. des Sciences, 1903.

teoretica, ha ammesso la pluralità delle sostanze agglutinanti. Il fatto che per vie tanto diverse si è giunti a conclusioni somiglianti, rende ancor più probativa la dimostrazione che noi crediamo di aver data dell'esistenza di due agglutinine distinte nel siero antitifico.

Occorre fare un'altra considerazione. Il fenomeno paradosso presente nei sieri agglutinanti è stato spiegato da Eisenberg e Volk coll'ammettere la presenza degli agglutinoidi; noi invece accennammo all'ipotesi dello « storno dei complementi agglutinanti ». Riflettendo ora bene da una parte sui risultati delle esperienze riferite in questa III parte e dall'altra sulle condizioni necessarie affinchè avvenga uno storno di complementi, non sappiamo a prima giunta renderci ragione del come il cloroformio possa stabilire simili condizioni nel siero. Infatti lo storno dei complementi presuppone una esuberanza di ambocettori: ora se questi ambocettori esistono già in eccesso nel siero specifico non trattato, il fenomeno si deve poter produrre anche senza cloroformio: ciò infatti è stato osservato in qualche caso, nel quale quindi questa spiegazione può essere adatta. Ma se gli ambocettori non sono in eccesso nel siero non trattato, il cloroformio verisimilmente non potrà farne accrescere il numero, e quindi il fenomeno non dovrebbe prodursi in nessuno dei due casi. Sembra quindi più adatta la ipotesi degli agglutinoidi, continuando ad ammettere con Ehrlich che le agglutinine siano delle aptine semplici e che una piccola parte di esse, quelle a maggiore affinità pei corpi batterici, si trasformi in modificazione inattiva: proagglutinoidi. Se non che non possiamo dimenticare le ingegnose ricerche del Bail, il quale mediante esperienze di riattivamento stabilì la costituzione complessa delle agglutinine.

Paragonando le ricerche del Bail e quelle di Eisenberg e Volk coi risultati di questo lavoro, sembra probabile che le agglutinine siano realmente delle aptine complesse, costituite di un ambocettore e di un complemento, che col Bail possiamo rispettivamente denominare agglutinoforo ed emiagglutinina.

Accettando questa ipotesi, non si rifiuta l'esistenza dei proagglutinoidi nè si rigetta l'ipotesi dello storno dei complementi. La spiegazione del fenomeno più ovvia e più rispondente ai fatti emerge conciliando le due ipotesi suddette e mettendole in rapporto col fatto stabilito dal Bail.

L'azione del cloroformio dovrebbe essere allora così interpretata:

Gli ambocettori, o agglutinofori, non subiscono alcuna influenza per azione del cloroformio, mentre una parte dei complementi, o

emiagglutinine, e specialmente quelli fra essi che hanno la massima affinità per gli agglutinofori, possono essere trasformati in modificazioni inattive, le quali diventano quindi capaci di produrre il fenomeno paradosso pel meccanismo descritto a pag. 23.

In armonia con questa supposizione, tanto le proto- che le deuteroagglutinine sarebbero costituite di agglutinofori e di emiagglutinine. L'azione inibitrice sull'agglutinazione sarebbe esercitata dalla trasformazione inattiva di una delle due agglutinine e più precisamente della protoagglutinina, fornita di un complemento molto instabile.

CONCLUSIONI.

I risultati principali di queste ricerche si possono così riassumere:

1° I recettori agglutinabili dei corpi batterici, in condizioni normali, esistono in scarsissima quantità allo stato libero nel liquido nutritivo di vecchie brodocolture.

2° I recettori agglutinabili possono essere artificialmente distaccati in grande quantità dai corpi batterici, senza perdere le loro proprietà agglutinogene.

3° Le modificazioni inattive delle agglutinine possono eccezionalmente trovarsi anche nei sieri freschi del sangue degli animali o dell'uomo affetti da tifo.

4° Le modificazioni inattive delle agglutinine del tifo possono ottenersi artificialmente, ma in quantità sempre piccole, diversamente da ciò che aveva osservato lo Shiga pel siero antidissenterico.

5° Le modificazioni inattive delle agglutinine interessano la sola parte complementare di esse, cioè le emiagglutinine.

6° Nel siero antitifoso delle cavie esistono almeno due specie di agglutinine:

a) Agglutinine facilmente attaccabili dal cloroformio e aventi la massima affinità pei corpi batterici: *protoagglutinine;*

b) Agglutinine non intaccate dal cloroformio e aventi minore affinità pei corpi batterici: *deuteroagglutinine*.

7° Probabilmente ciascuna di queste due agglutinine risulta costituita di un ambocettore (agglutinoforo) e di un complemento (protoemiagglutinina o deuteroemiagglutinina).

NB. Levaditi avrebbe dimostrato (Comptesrendus de la Soc. dc Biologie, 1902) che l'ipotesi dello « storno dei complementi », formulata da Neisser e Wechsberg per spiegare il fenomeno paradosso dei sieri litici e battericidi, è inesatta. I suoi risultati tuttavia somigliano molto ai nostri. Levaditi infatti è stato indotto dai risultati delle sue esperienze ad ammettere la duplicità delle sostanze *battericide* specifiche; egli però crede che il complemento sia unico, e che sia duplice l'ambocettore. La battericidia non può essere prodotta che da uno dei due ambocettori, che egli chiama *attivo*; a condizione però, che esso si unisca con recettori determinati dei corpi batterici. Quando l'altro ambocettore, che Levaditi chiama *inattivo*, esiste in quantità troppo elevata, impedisce l'unione di cui parliamo, perchè possiede verso gli stessi recettori batterici un'affinità più forte: l'azione battericida quindi manca. Secondo il Levaditi inoltre l'ambocettore attivo non resta mai libero nel siero, ma si unisce con alcuni recettori batterici che sono incapaci a lasciarne manifestare l'azione battericida.

Qualora queste vedute fossero riconosciute esatte, sarebbe agevole conciliarle colle nostre esperienze, ammettendo che la deuteroagglutinina non resti libera nel siero, ma si unisca invece ad alcuni recettori incapaci a farne manifestare l'azione agglutinante. Si avrebbero dunque due specie di recettori batterici agglutinabili. Tuttavia non possiamo accettare senz'altro le conclusioni del Levaditi, perchè l'esposizione delle sue esperienze non ci permette un confronto analogico con le nostre. Per questa ragione abbiamo omesso di parlarne nel corso del lavoro.

ISTITUTO ANTIRABBICO MUNICIPALE DI ROMA
presso l'Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università

Le vaccinazioni antirabbiche dal 1889 al 1902

Relazione del Dott. **SANTO MARINO-ZUCO.**

Nel presentare il rendiconto del primo tredicennio dell'Istituto antirabbico di Roma (1), avanti di esporre il riassunto statistico, credo utile riportare alcuni dati tecnici, in uso nell'Istituto, e che l'esperienza ci ha dimostrato buoni. Riferirò altresì alcune osservazioni ed alcuni importanti casi clinici, che dimostrano l'utilità della cura e la necessità di ripeterla al comparire dei primi sintomi premonitori. Accennerò infine a pochi casi refrattari alla cura, ed alla sua inefficacia nella malattia sviluppata.

PARTE PRIMA.

Tecnica e osservazioni cliniche.

I. — TECNICA.

La cura, che nei primi anni praticavasi con una iniezione quotidiana per 14 a 18 giorni in uno o due cicli, negli anni successivi fu resa sempre più intensiva. Dal 1895 cominciammo a tralasciare i midolli di 14ª e 13ª g. (2), a prolungare la durata della cura dai 18 ai 30 giorni e circa 40 nei casi gravissimi, e a praticare due iniezioni al giorno.

Negli ultimi anni la cura fu praticata in 2 a 4 cicli presso a poco come nel seguente quadro:

(1) L'Istituto fu aperto nell'agosto 1889, ma cominciò a funzionare nel novembre dello stesso anno. Esso dipende ed è a spese del municipio; ha sede, per cortese concessione, presso quello d'igiene sperimentale della R. Università. La direzione è gratuitamente assunta dal prof. Angelo Celli. La cura è ambulatoria ed è gratuita per tutti.

(2) Dai primi dell'anno 1903 la cura s'inizia coi midolli di 9ª o 8ª giornata.

TABELLA I. -

A DATA	*A* Midolli iniettati Mattina	*A* Midolli iniettati Sera	*B* DATA	*B* Midolli iniettati Mattina	*B* Midolli iniettati Sera
1° ciclo.			*1° ciclo.*		
1° giorno	M12	M11	1° giorno	M12	M11
2° »	M10	M9	2° »	M10	M9
3° »	M8	M7	3° »	M8	M7
4° »	M6	M6	4° »	M6	M6
5° »	M5	M5	5° »	M5	M5
6° »	M4	M4	6° »	M4	M4
7° »	M4	M4	7° »	M3	M3
8° »	M3	M3	8° »	M3	M3
9° »	M3	M3	9° »	M2	M2
10° »	M2		10° »	M2	M2
11° »	M2				
			2° ciclo.		
2° ciclo.			11° giorno	M5	M4
12° giorno	M5	M4	12° »	M4	M3
13° »	M4	M3	13° »	M3	M3
14° »	M3	M3	14° »	M3	M2
15° »	M3	M3	15° »	M2	M2
16° »	M2	M2	16° »	M2	M2
17° »	M2	M2	17° »	M1	
18° »	M2				
			3° ciclo.		
			18° giorno	M5	M4
			19° »	M3	M3
			20° »	M3	M3
			21° »	M2	M2
			22° »	M2	M2
			23° »	M1	

Metodi di cura.

C		
DATA	Midolli iniettati	
	Mattina	Sera
1° ciclo.		
1° giorno	M_{12}	M_{11}
2° »	M_{10}	M_{9}
3° »	M_{8}	M_{7}
4° »	M_{6}	M_{6}
5° »	M_{5}	M_{5}
6° »	M_{4}	M_{4}
7° »	M_{4}	M_{3}
8° »	M_{3}	M_{3}
9° »	M_{3}	M_{3}
10° »	M_{2}	M_{2}
11° »	M_{2}	M_{2}
12° »	M_{1}	
2° ciclo.		
13° giorno	M_{5}	M_{4}
14° »	M_{4}	M_{4}
15° »	M_{3}	M_{3}
16° »	M_{3}	M_{3}
17° »	M_{3}	M_{3}
18° »	M_{2}	M_{2}
19° »	M_{2}	M_{2}
20° »	M_{2}	M_{2}
21° »	M_{1}	
22° »	M_{1}	
3° ciclo.		
23° giorno	M_{4}	M_{4}
24° »	M_{3}	M_{3}
25° »	M_{3}	M_{3}
26° »	M_{2}	M_{2}
27° »	M_{2}	M_{2}
28° »	M_{2}	M_{2}
29° »	M_{1}	
30° »	M_{1}	

D		
DATA	Midolli iniettati	
	Mattina	Sera
1° ciclo.		
1° giorno	M_{12}	M_{11}
2° »	M_{10}	M_{9}
3° »	M_{8}	M_{7}
4° »	M_{6}	M_{6}
5° »	M_{5}	M_{5}
6° »	M_{4}	M_{4}
7° »	M_{4}	M_{3}
8° »	M_{3}	M_{3}
9° »	M_{3}	M_{3}
10° »	M_{2}	M_{2}
11° »	M_{2}	M_{2}
12° »	M_{1}	
13° »	M_{1}	
2° ciclo.		
14° giorno	M_{5}	M_{4}
15° »	M_{4}	M_{4}
16° »	M_{3}	M_{3}
17° »	M_{3}	M_{3}
18° »	M_{3}	M_{3}
19° »	M_{2}	M_{2}
20° »	M_{2}	M_{2}
21° »	M_{2}	M_{2}
22° »	M_{1}	
23° »	M_{1}	
3° ciclo.		
24° giorno	M_{4}	M_{4}
25° »	M_{4}	M_{3}
26° »	M_{3}	M_{3}
27° »	M_{3}	M_{3}
28° »	M_{2}	M_{2}
29° »	M_{2}	M_{2}
30° »	M_{2}	M_{2}
31° »	M_{1}	
32° »	M_{1}	
4° ciclo.		
33° giorno	M_{4}	M_{3}
34° »	M_{3}	M_{3}
35° »	M_{2}	M_{2}
36° »	M_{2}	M_{2}
37° »	M_{1}	
38° »	M_{1}	
39° »	M_{1}	

Però, dobbiamo dichiarare che l'esperienza ci ha dimostrato che non devesi stabilire una cura più o meno costante per tutti, *ma che è più conveniente variare per ciascun caso le inoculazioni sia per quantità come per intensità, a seconda dell'età e costituzione di ciascuno individuo, e della sede, quantità e gravità delle morsicature.*

Anche a noi risulta evidente quanto disse il Perdrix (1), che il metodo Pasteur deve essere applicato d'una maniera speciale in ciascun caso particolare, e che ciascun malato deve essere trattato secondo la gravità delle sue morsicature. I risultati provano d'anno in anno che i trattamenti fatti in tal modo dànno effetti migliori.

La cura per solito s'intraprende al più presto possibile, ma la eseguiamo anche se i morsicati si presentano tardi. Nell'aprile 1902 sottoponemmo a una cura lunga e intensa un morsicato gravissimo dopo 32 giorni dalla morsicatura. Egli era stato respinto da altro Istituto perchè ormai era troppo tardi, e la cura inutile. L'esito della nostra cura fu ottimo.

L'emulsione vien fatta, per ciascun curando con $^1/_2$ a 1 centimetro di midollo triturato in 2 a 3 cmc. d'acqua distillata salata al 5 $^0/_{00}$ e sterilizzata. Nei casi gravissimi si tritura centimetri 1 $^1/_2$ a 2 in 4 e 4 $^1/_2$ cmc. d'acqua d. s. s.

La triturazione si fa in bicchierini a calice con fondo concavo, mediante una bacchetta grossa di vetro con estremo conico smerigliato. Il bicchierino è coperto da un coperchio, simile ad una capsula Petri, con smeriglio corrispondente all'orlo smerigliato del bicchiere.

L'emulsione s'inietta densa appena fatta: se vi sono molti a curare, ogni tanto si agita il bicchierino e si aspetta soltanto che depositino le particelle più grosse.

Le iniezioni sono eseguite nel sottocutaneo delle pareti antero-laterali dell'addome, ovvero nei casi gravi anche sul sito delle morsicature quando esistono dolori locali. Una sola volta per volontà dell'inferma le eseguimmo tutte sulle spalle, braccia e avambraccia, ma riuscirono assai incomode e dolorose a conferma della stessa malata.

Quasi sempre le inoculazioni non dànno alcuna reazione locale nè disturbi generali; talvolta si avvera leggero e fugace arrossimento della zona d'iniezione negli individui con panicolo adiposo abbondante e resistente, o nei casi gravi nei quali s'iniettano le quantità massime di emulsione.

Però in taluni individui, anche magri, eziandio le minime dosi (1 cmc.) provocano reazione locale e talvolta intensa, ma che scompare sempre in 24 o 48 ore. Questo fatto non si può attribuire alla emulsione perchè la stessa e nella identica quantità iniettata nella stessa seduta a vari altri individui non provoca in questi reazione di sorta. La reazione dipende quindi da condizioni meccaniche locali per la quantità del liquido o per particolare irritazione dei tessuti.

---

(1) Annales de l'Institut Pasteur, 1890, pag. 132.

Nelle persone, nelle quali le iniezioni provocano una qualsiasi reazione, si usa iniettare la dovuta quantità, con 2 o 3 punture in punti diversi, soltanto nei primi periodi della cura, perchè, spesso, negli ultimi, anche in costoro la reazione è quasi nulla.

Le iniezioni vengono fatte con siringhe Tursini semplicizzate, fatte cioè da un ago cannula senza tettina, innestata alla lampada sopra una cannula di vetro del diametro di 6 millimetri e della lunghezza di 23 centimetri.

Nella sterilizzazione da 150° a 200° C., l'ago col corrispondente estremo della cannula è tenuto immesso con ovatta in un tubo da saggio; l'estremo libero è chiuso da un tamponcino di ovatta.

Tali siringhe hanno capacità di 6 cmc. circa. Per ciascun curando si adopera una siringa.

II — Dolori premonitori.

Alcuni morsicati gravemente accusano dei dolori sul sito delle morsicature, senza poterli attribuire a qualsiasi altra causa. Ora li avvertono durante la cura, ora appena terminata, ora molto tempo dopo. Tali dolori spesso sono lievi e fugaci o ritornano più volte, ma per poco tempo. Talvolta però sono abbastanza vivi ed anche trafittivi e lancinanti, appaiono ad accessi più o meno frequenti, ma quasi sempre di breve durata; cominciano dalle lesioni di continuo prodotte dall'animale morsicatore, sia o no causticate o dalle cicatrici sussecutive, e s'irradiano alla periferia di esse o anche a distanza seguendo il tragitto dei tronchi nervosi maggiori. Spesso essi sono i prodromi più o meno lontani dello svolgersi del morbo fatale. Essi indicano che il virus inoculato è stato intenso o per quantità o qualità, che esso tende ad invadere i centri, e che la cura finora è insufficiente.

Perciò se apparvero durante la cura, rendemmo questa rapidamente intensiva e la prolungammo oltre il termine stabilito, finchè per vario tempo i curati non accusarono ulteriori dolori; se dopo il termine di essa ricominciammo la cura con midollo di 12° g. o meno, a seconda del tempo passato dal termine di essa e la proseguimmo rapidamente con due o più iniezioni al giorno, per uno o due cicli, secondo il bisogno. In nessun caso ci è occorso prolungarla per maggior tempo. In entrambi i casi giunti ai midolli forti, se i dolori persistevano e si estendevano facemmo le iniezioni in tutto o in parte sotto le lesioni di continuo o sotto le cicatrici o alla periferia di esse o lungo il decorso dei nervi passionati.

In vari casi ottenemmo in tal modo degli ottimi effetti, ed acquistammo la convinzione che mediante la cura Pasteur scongiurammo

in essi lo sviluppo della rabbia di cui già apparivano i primi sintomi. Infatti, alcuni di questi curati oltre ai dolori presentavano melanconia, agitazione, insonnia e febbre, e taluni anche alterazioni anatomiche delle cicatrici, cioè turgore e arrossimento di esse o formazione di flittene, o comparsa di chiazze rosse papuliformi a contorno irregolare sparse sul distretto nervoso delle morsicature.

Nè si può supporre che tali benefici effetti dipendessero da suggestione in individui isterici o nevrastenici. Fra tali curati, è vero, furonvi *riassoggettati* dei soggetti nevrastenici, ma di essi non ne tenemmo menzione. In costoro rifacemmo la cura per pochi giorni a solo scopo di guarirli dei disturbi nervosi, ma sicuri che nessun male a loro minacciava. Difatti, essi tranquillizzati per la sicurezza dell'effetto della cura ritornavano a godere il loro abituale benessere. In tre di costoro dovemmo ripetere la cura per pochi giorni per la terza volta nello spazio di un anno. Non potevamo però ammettere tale ipotesi in pochi altri nei quali ci parve evidente si trattasse di prodromi del male.

Tale convinzione la cominciammo ad avere fin dal 1891, in seguito ad un caso assai evidente per quanto triste.

Un tale R... P..., fu morsicato il 1° ottobre 1891 e riportò 4 fori grandi e 7 piccoli alla mano sinistra. Tali ferite sanguinarono ma non furono causticate. Cominciò la cura dopo 4 giorni dalla morsicatura e fece la cura massima, che facevasi in quel tempo, cioè 22 giorni con una iniezione quotidiana. Dimesso dalla cura fu pregato ritornare al nostro Istituto qualora si sentisse male. Dopo qualche tempo cominciò ad avvertire dolori alla mano morsicata ma non si presentò all'Istituto perchè il suo medico lo tranquillizzò dicendogli che dopo la cura nulla v'era a temere. Dopo pochi giorni i dolori scomparvero ed il R... riacquistò la sua calma ed il benessere. Erano ormai scorsi 4 mesi dalla morsicatura quand'egli ricominciò ad avvertire dolori più intensi alla mano, dolori che nei giorni seguenti si estesero a quasi tutto l'arto. Il R... s'impressionò e ridomandò consiglio al medico, che lo calmò di nuovo: ed egli ricordandosi ch'erano spariti la volta precedente vi prestò fede tanto che venne a Roma e non si presentò all'Istituto. I dolori proseguirono più giorni ma poi sparirono. Decorsero altri 4 mesi di benessere relativo con qualche dolore intermittente quando il 19 agosto 1892 i dolori si rifecero più intensi e si propagarono a tutto l'arto. Egli continuò a viver quieto sino al 23 agosto, giorno, in cui cominciarono i sintomi di spasmo faringeo, idrofobia, oppressione toracica, ecc. Il 24 in tali condizioni spaventato si presentò al nostro Istituto raccontandoci la storia sopradetta. Fu accolto subito nell'Ospedale S. Antonio ed alle ore 17 cominciò il delirio furioso e alle 4 del 25 avvenne la morte.

Io credo che in questo caso una cura più intensiva e ripetuta in seguito al manifestarsi dei dolori intensi e prolungati avrebbe salvato quel povero infelice da sì terribile morte.

Da quell'epoca a tutti i morsicati curati ripetiamo con insistenza ma in modo da non preoccuparli, ***che per oltre un anno all'apparire dei dolori premonitorii si ripresentino subito al nostro Istituto.***

Trascrivo qui appresso in breve la storia di pochi casi evidenti tralasciando tutti gli altri nei quali si fosse potuto elevare qualche dubbio di potersi trattare di guarigione per suggestione in individui isterici o nevrostenici.

Storie cliniche.

I.

C... E..., di anni 23, d'Aspra Sabina, fu morsicato in aperta campagna, il 12 aprile 1893, da un grosso cane corso, girovago, che morsicò anche moltissimi cani, capre, majali e poi si rifugiò nella foresta, dove non fu più rintracciato.

Il C... lottò col cane varii minuti prima di potersi liberare e nella lotta riportò sulla regione anteriore del ginocchio sinistro 6 fori, uno dei quali profondo sino all'osso, e 3 altri grossi fori sulla regione mammillare sinistra.

Le parti lese erano al coperto ma i vestiti restarono lacerati a pezzetti ed imbevuti di bava.

Le ferite furono causticate col ferro rovente dopo 10 ore dalla morsicatura.

Il C... cominciò la cura al 12° giorno dall'accaduto e la proseguì mattina e sera per 21 giorni raggiungendo al 3° giro il M_2.

Dopo 13 giorni dal termine della cura e 47 dalla morsicatura si ripresenta il C... accusando dei dolori trafittivi sulle cicatrici delle morsicature, dolori che lo tormentavano e lo rendevano agitato.

Furono subito cominciate le iniezioni mattina e sera e dal 28 maggio 1893 furono proseguite sino all'11 giugno 1893. Dopo 3 giorni il malato è più tranquillo e dice avvertire le trafitture meno intense e più rare. Al 10° giorno di cura è cessato ogni dolore.

II.

T... R..., di anni 53, da Lucoli Alto, proveniente da S. Oreste, guardiano di pecore, fu morsicato il 1° marzo 1894, da un cane di sua conoscenza, che aveva abbandonata la casa. Il cane, incontrato il T... gli si avventò e morsicò alla mano destra e dopo pochi minuti gli si riavventò addentandolo fortemente all'altra mano e lo tenne stretto a lungo finchè il T... riuscì ad afferrare un bastone lì vicino ed uccidere il cane, che continuava a tenere stretta la mano sinistra. In tale lotta riportò ferite multiple alle mani ed alla coscia sinistra, che furono causticate dopo molte ore.

Cominciò la cura il 4 marzo 1894 e fu dimesso il 3 aprile in ottime condizioni. Furono fatti 4 cicli facendo inoculazioni mattina e sera.

Il 21 maggio 1894 cioè dopo 80 giorni dalla morsicatura e 47 dal termine

della cura il T... si ripresenta all'Istituto e racconta che il 7 maggio gli si sono completamente cicatrizzate le ferite della mano sinistra e quasi contemporaneamente cominciò ad avvertire delle punture, dei leggeri dolori sul sito delle cicatrici, dolori che si andarono gradatamente e lentamente estendendo al polso, all'avambraccio e alla spalla corrispondente.

La persistenza di tali dolori e l'aumento progressivo di essi, mancando qualsiasi altra causa, che li spiegasse, non avvertendo alcun altro disturbo, lo spinsero a ripresentarsi all'Istituto.

Noi tenendo conto che il T... era un contadino di corta intelligenza e calmo, che si presentava a noi dopo circa 14 giorni dall'inizio dei suoi dolori e soltanto quando questi erano divenuti assai forti, che egli nel suo racconto era tranquillo nè sembrava un uomo suggestionato dalla paura del male, ritenemmo assolutamente trovarci avanti ad un caso simile a quello del R...

Perciò lo sottoponemmo a due giri di cura rapida ed intensiva.

26 maggio 1894. Dolori diminuiti e ad accessi più rari.

27 maggio 1894. Cessati i dolori all'arto ma persistenti quelli sulle cicatrici.

29 maggio 1894. Cessati del tutto i dolori.

31 maggio 1894. Ricomparsa di dolori sulle cicatrici e sul braccio. S'iniettano mattina e sera 2 cmc. di M_4 sulla regione esterna del braccio.

1° giugno 1894. Scomparsi i dolori al braccio. S'inoculano mattina e sera 2 cmc. di M_3 sulla regione anteriore del braccio.

2 giugno 1894. Mattina 2 cmc. M_3; sera 2 cmc. M_2.

3 giugno 1894. Mattina e sera 2 cmc. M_2 nella faccia anteriore del braccio.

4 giugno 1894. Mattina e sera 2 $^1/_2$ cmc. M_2 sul dorso dell'avambraccio. Scomparso ogni dolore anche sulle cicatrici.

7 giugno 1894. Fine della cura. In seguito non avvertì mai alcun sintomo riferibile alla presente malattia.

III.

G... A..., di anni 37, da Zagarolo, fu morsicato il 13 agosto 1896 da un cane riconosciuto clinicamente con certezza idrofobo, al dorso della mano sinistra riportando 5 fori. Fece la cura dal 16 agosto al 29 settembre con interruzione di dieci giorni.

Il 21 ottobre egli comincia ad avvertire dolori al dorso della mano morsicata, che aumentano il giorno seguente e si estendono all'avambraccio. Si ripresenta al nostro Istituto e fu sottoposto ad un giro di cura intensiva dal 21 al 30 ottobre. I dolori dopo 5 giorni cominciarono a diminuire ed al 7° giorno erano cessati completamente.

IV.

F... E..., di anni 30, da Roma, fu morsicato il 29 marzo 1897 e riportò 8 grossi fori sulla mano destra, i quali non furono causticati.

Il cane morsicatore fu tenuto in osservazione nello stabulario municipale

di Porta Portese e presentò tutti i sintomi clinici di rabbia furiosa che fu confermata sperimentalmente.

Il F... cominciò una cura intensiva dopo 3 giorni dalla morsicatura e la proseguì per 45 giorni perchè al 16° giorno accusò forti dolori alla mano morsicata ed all'avambraccio corrispondente, dolori, che persistettero fino al 24° giorno. Il 25° giorno cominciarono a diminuire e cessarono al 27° giorno per ricomparire al 33° giorno intermittenti per la durata di soli pochi giorni, Gradatamente poi diminuirono e cessarono per sempre.

V.

S... V..., di anni 22, da Fajano, fu morsicato il 31 agosto 1897 da un cane da guardia, che morsicò due altre persone e tredici cani, uno dei quali, tenuto in osservazione morì di rabbia dopo 37 giorni dalla morsicatura.

Il S... riportò sulla regione dorsale della mano destra, tra il pollice e l'indice, due fori profondi sino all'osso, che furono causticati col ferro rovente mezz'ora dopo dallo stesso infermo, e dopo 18 ore dal medico.

La cura iniziata dopo 10 giorni dalla morsicatura e proseguita con discreta intensità, fu resa più intensa dal giorno in cui si seppe della morte dell'animale di controllo.

Il giorno 11 ottobre, cioè 42 giorni dalla morsicatura, il S... sempre tranquillo, nulla sapendo dell'animale di controllo e della morte di esso, ora anche più allegro essendo scorsi i 40 giorni ritenuti dal volgo più pericolosi, oltre i quali non si muore di rabbia, ci accusò scherzosamente che avvertiva dei dolori intorno alle ferite, e specialmente intorno a quella situata in corrispondenza del primo metacarpo.

Si tenne gran conto di tale dichiarazione, e pur dando al malato erronee spiegazioni e nulla facendogli comprendere del suo stato, resi subito intensissima la cura inoculando mattina e sera 6 cmc. per volta d'emulsione fatta con 2 cm. di M_1.

La mattina del 12 i dolori suddetti sono più intensi e s'irradiano sino al terzo inferiore dell'avambraccio. Sono dolori trafittivi, lancinanti parosistici con ritorno ogni 15-20 minuti e della durata di pochi minuti. Stato generale buono.

12 ottobre, ore 11. Iniezione 6 cmc. emulsione fatta con 2 cm. M_1: però 4 cmc. nel sottocutaneo dell'addome e 2 cmc. nel sottocutaneo del terzo inferiore dell'avambraccio destro.

12 ottobre, ore 16. Dolori non aumentati; melanconia, faccia stravolta, leggera febbre.

L'infermo non è punto preoccupato del suo stato. Idem emulsione divisa così: 4 cmc. nel sottocutaneo intorno e sotto le cicatrici delle morsicature e 2 cmc. nella regione anteriore del terzo medio e terzo inferiore dell'avambraccio destro.

12 ottobre, ore 20. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_3 nel sottocutaneo dell'addome.

13 ottobre, ore 8. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_4 nel sottocutaneo dell'addome.

13 ottobre, ore 11. 6 cmc. emulsione con 2 cm. M_3 nel sottocutaneo dell'avambraccio (seguendo il percorso del brachiale cutaneo esterno e del ramo superficiale del nervo radiale).

13 ottobre, ore 16. 4 cmc. emulsione con 2 cm. M_3 nel sottocutaneo dell'avambraccio, terzo superiore.

14 ottobre, ore 8. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_3 nel sottocutaneo dell'addome.

14 ottobre, ore 11. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_2 nel sottocutaneo dell'addome.

14 ottobre, ore 16. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_2 nel sottocutaneo dell'addome. I dolori sulle cicatrici sono diminuiti. È cessata la febbre.

15 ottobre, ore 8. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_2 nel sottocutaneo dell'addome.

15 ottobre, ore 11. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_2 nel sottocutaneo dell'addome.

15 ottobre, ore 16. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_2 nel sottocutaneo dell'addome.

16 ottobre, id. del 15 ottobre.

17 ottobre, ore 11. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_1 nel sottocutaneo dell'addome.

17 ottobre, ore 16. 5 cmc. emulsione con 2 cm. M_1 nel sottocutaneo dell'addome.

18 ottobre, ore 11. 4 cmc. emulsione con 2 cm. M_1 nel sottocutaneo dell'addome e $^1/_2$ cmc. sotto le cicatrici. I dolori sono cessati completamente. così pure lo stato melanconico.

19 e 20 ottobre. Idem.

21 ottobre. Si sospende la cura e si tiene in osservazione il S..., il quale il 15 novembre riavverte dolori discreti sotto le cicatrici.

Si ricomincia un nuovo ciclo di cura intensiva dal M_8 al M_1, facendo un'iniezione al giorno. L'8 dicembre si sospende la cura, giacchè il S... da varii giorni non avverte alcun dolore. È tenuto in osservazione varii altri giorni, e seguitando sempre il completo benessere, viene dimesso. In seguito non ebbe altro incidente.

VI.

F. P..., di anni 4, d'Arsoli, morsicato il 23 giugno 1898 da un cane riconosciuto idrofobo sperimentalmente, da cui riportò una ferita cutanea di 3 cm. sull'addome, al coperto forse della sola camicina, cominciò la cura al 20° giorno dalla morsicatura. Dopo 7 giorni dall'inizio della cura, il bambino avvertì leggeri dolori sul sito delle ferite, che proseguirono per varii giorni con graduale aumento.

Il 26 luglio di tratto in tratto si lagna di fortissimi dolori sulla ferita e sulla sua periferia, tanto che spesso piange per tali dolori.

Per varii giorni, e più volte al giorno, s'iniettano intorno alla ferita 2 cmc. e $^1/_2$ d'emulsione fatta con 1 cm. e $^1/_2$ di midollo della giornata che spetta, arrivando più volte al midollo di 1ª giornata.

Il 3 agosto i dolori son cessati, il bambino sta bene ed è più allegro. Termina la cura il 18 agosto.

VII.

E. G..., di mesi 32, da Viterbo, domiciliato a Vetralla, il 6 gennaio 1899 riportò una ferita contusa cutanea, di figura quasi circolare, della grandezza di 1 cm. sul dorso della mano sinistra per morsicatura di un cane riconosciuto idrofobo clinicamente e sperimentalmente. La ferita non fu causticata nè curata.

Cominciò la cura il 27 gennaio facendo una iniezione al giorno. Il 21 febbraio il bambino accusò forti dolori sulla ferita ad accessi della durata ciascuno di circa un quarto d'ora.

22 febbraio. Nella notte il bambino ebbe febbre e nella giornata fu inquieto e fece molte stranezze, mentre era stato sempre tranquillo. Il bambino piange pel dolore. Iniezioni intorno e sotto le cicatrici.

23 febbraio. Idem. Clisteri di camomilla e aceto; bromuro di potassio.

24 febbraio. Continua nelle stesse condizioni. Idem.

25 febbraio. Il dolore al braccio è cessato, ed il bambino è calmo ed ha ripreso il suo carattere abituale.

2 marzo. Fine della cura.

VIII.

A. E., di anni 27, da Roma, domiciliata piazza in Lucina 21, è stata morsicata il 7 dicembre 1899 da un gatto riconosciuto idrofobo sperimentalmente. Riportò sei grossi fori ed una ferita lacera cutanea di 5 cm. sulla faccia dorsale del polso destro a nudo. Le ferite hanno sanguinato e non sono state causticate. Cominciò la cura il 30 dicembre 1899 facendo 4 cicli con una iniezione al giorno.

Le iniezioni furono fatte alle braccia, essendosi la signora rifiutata a farle all'addome.

10 febbraio 1900. Febbre, insonnia, agitazione.

11, 12 e 13 febbraio. Idem e dolori vaghi agli arti superiori.

14 febbraio. Diminuzione dei dolori, dell'insonnia. Cessata la febbre.

15 febbraio. Cessati i dolori. Benessere.

25 febbraio. Fine della cura.

6 marzo 1900. La signora si ripresenta all'Istituto avendo avvertito da due giorni forti dolori più o meno continui sulle ferite e sull'avambraccio e braccio destro.

Le ferite sono tumide, arrossate e dolenti e su ciascun foro s'è formata una flittena piena di liquido torbido, che già si era vuotata nel presentarsi a noi. Ha insonnia e melanconia. Si fa un ciclo rapido, cominciando dal M_6 mattina e sera.

7 marzo. Idem. Si prescrive del bromuro e cloralio.

8 marzo. Notte più calma; ha dormito: le ferite sono meno tumide ed arrossate: cade l'epidermide delle flittene. Le iniezioni si fanno lungo il braccio e nella regione sopra e sotto-clavicolare con 4 cmc. d'emulsione fatta con 2 cm. di midollo.

9 marzo. Notte calma senza bromuro e cloralio. Diminuiti i dolori in cor-

rispondenza delle ferite che sono asciutte. Alcune appena visibili. Persistono solo i dolori al braccio ed avambraccio.

10 marzo. Nessun dolore. Sui fori della morsicatura piccole crosticine con alone rossastro. La signora è più ilare e di migliore aspetto.

11 marzo. Sonno tranquillo; cadute le crosticine; cicatrici rosee. Qualche dolore nell'arto a sede non fissa a lunghissimi intervalli. Iniezione di 4 cmc. d'emulsione fatta con 2 cm. M_1 sul polso alla periferia delle ferite.

12 marzo. Benessere. Fine della cura.

27 novembre 1900. La signora si ripresenta all'Istituto perchè da circa tre mesi ad intervalli avverte dei dolori più o meno violenti sul braccio destro, e specialmente sulle cicatrici delle morsicature, dolori che si estendono in tutto il braccio sino alla regione sopra-clavicolare destra.

Rifà un altro ciclo di cura intensiva cominciando dal M_{10}.

10 dicembre. Intorno alle cicatrici sul dorso della mano destra si nota un'eruzione a macchie rosso cupo e piccole papule. I dolori persistono, anzi sono più forti, tanto che la notte non può dormire.

13 dicembre. L'eruzione è quasi scomparsa. Si vedono solo piccole crosticine; i dolori sono diminuiti assai; notte tranquilla, normale.

14 dicembre. Cessati i dolori; benessere.

17 dicembre. Fine della cura. In seguito non ebbe altri disturbi riferibili possibilmente alla presente malattia.

IX.

A. A..., di anni 6, da Genazzano, fu morsicata il 4 maggio 1900 da un cane riconosciuto idrofobo sperimentalmente. Riportò 8 fori e piccole ferite sulla mano e avambraccio sinistro, e 6 piccole ferite sull'avambraccio destro a nudo.

Due fori della regione tenare erano trasfossi.

Nessuna causticazione nè medicatura.

7 aprile 1900. Inizio della cura, di cui si fanno 4 cicli inoculando 3 cmc. d'emulsione ed in ultimo 4 cmc. e $^1/_2$.

6 maggio. Dolori sulle ferite della mano ed avambraccio sinistro.

8 maggio. Cessato il dolore. Sul polso sinistro appare una chiazza rossa quanto un centesimo, a superficie irregolare, prominente, con piccola vescicola. Non dà prurito.

10 maggio. Appariscono altre 6 chiazze eguali, circolari, di colorito rosso vivo con leggero sollevamento epidermico. Due di esse corrispondono a due ferite del cane.

13 maggio. Le 7 chiazze persistono dello stesso colore.

16 maggio. Scomparsa delle chiazze, benessere e fine di cura.

La bambina rimase in osservazione sino al 27 maggio sempre in ottima salute.

III. — Casi refrattari alla cura.

I casi della nostra statistica sono in maggioranza di discreta gravezza. Fra essi però vi sono 60 casi gravissimi e fra questi, 20 che, per la loro importanza meriterebbero d'essere descritti ma non lo facciamo per brevità. Quando ci si presentarono tali disgraziati per la molteplicità delle loro ferite, molte delle quali lacere e trasfosse, per l'estensione e la profondità di esse, per la sede in parti scoperte e ricche di terminazioni nervose e per l'essere state per lungo tempo in contatto coll'animale morsicatore, pensammo subito di trovarci avanti a casi certamente fatali e nei quali la cura non avrebbe avuto il tempo di essere efficace. Eppure dopo una cura lunghissima e rapidamente intensiva tutti restarono immuni. A buon dritto quindi potremmo quasi aggiungere i presenti ai precedenti casi descritti, nei quali è nettamente delineata l'efficacia della cura.

Ma se in questi fummo così fortunati in cinque altri casi l'esito fu negativo, non ostante che la cura rapida e intensa fosse stata proseguita per 32, 33, 35, 41, 49 giorni. Questi insuccessi trovano la loro esplicazione nella virulenza e quantità di virus inoculato sulle molteplici e gravi ferite e nella lentezza con la quale lo stato refrattario si sviluppa in certi organismi.

Nell'ultimo caso di questi possiamo dire di essere stati altrettanto insistenti per quanto fu ostinato il male. Furono fatte molteplici iniezioni intorno alle ferite e cicatrici con effetto talvolta appariscente con cessazione cioè dei dolori e con miglioramento delle lesioni di continuo. Al primo apparire dei sintomi rabbici feci anche delle iniezioni endospinali senza alcun effetto. Col liquido estratto colle punture alla Quincke feci delle inoculazioni nei conigli sotto la dura cranica e nell'addome ma gli animali tenuti in osservazione per oltre un anno stettero sempre bene.

Questo caso sarebbe davvero scoraggiante, ma essendo unico, dobbiamo metterlo fra i casi nei quali l'immunità non si manifesta a causa di particolarità individuali.

Di questo caso interessantissimo mi piace trascrivere la storia clinica.

Storia clinica.

L. . . A. . ., di anni 3, da Torre dei Passeri, provincia di Teramo, fu morsicata il 27 gennaio 1900 da un cane girovago, riportando le seguenti lesioni su parti tutte a nudo: un foro grosso sulla regione temporale destra in vicinanza dell'orlo orbitario esterno: un foro grosso sul sopracciglio de-

stro ed un altro eguale in vicinanza dell'angolo esterno del sopracciglio sinistro; idem sulla guancia sinistra: una ferita muscolo cutanea a semiluna di 7 centimetri sulla regione temporo-parietale sinistra con scopertura dell'osso; tre ferite cutanee di 3 centimetri l'una sulla regione parieto occipitale sinistra; escoriazioni multiple sulla testa. Le ferite han sanguinato molto.

Al 4° giorno dalla morsicatura fu accolta all'Ospedale di Sant'Antonio da dove giornalmente era condotta al nostro Istituto. S'iniziò subito la cura che fu rapida e intensa. Nel primo ciclo si raggiunse il M_1 e si ripetè per tre volte e quattro nel secondo ciclo.

Al termine di questo cioè il 24 febbraio la bambina nella notte accusò forti dolori sulle ferite orbitarie e temporali. Interrogata sulla qualità del dolore la poverina si esprimeva benissimo dicendo che nei momenti del dolore sentiva come se il cane la stesse rimordendo.

Il 24, 25 e 26 febbraio oltre le iniezioni all'addome s'iniettarono nelle regioni preauricolari e temporali anteriori 2 cmc. d'emulsione fatta con un centimetro e mezzo di M_1.

Il 26 la bambina non accusò più alcun dolore sulle ferite. La suppurazione di esse diminuì ed il loro aspetto migliorò assai.

Dal 27 febbraio al 4 marzo si proseguì la cura solita coi midolli più forti due volte al giorno. Così pure in seguito sino al 18 nonostante le iniezioni fatte intorno alle ferite.

5 marzo. Ritorno dei dolori sulle regioni delle ferite, ridiventate segreganti e di brutto aspetto. Iniezioni di 2 cmc. d'emulsione fatta con un centimetro e mezzo di M_1.

6 marzo. Notte tranquilla: ha dormito sempre con sonno calmo.

7 marzo. Iniezioni sulla tempia destra al mattino e sulla tempia sinistra alla sera con 3 cmc. d'emulsione fatta con 2 cm. di M_1.

8 marzo. I siti dell'iniezioni di ieri sono edematosi come pure le palpebre di sinistra.

9 marzo. Scomparso l'edema delle palpebre e dei siti dell'iniezione.

10-11 marzo. Benessere; sonni tranquilli; nessun dolore.

12 marzo. Dolori alla testa intorno alle ferite: iniezioni come sopra intorno ad esse.

17 marzo. Persistendo a tratti i dolori iniezioni come sopra alle tempie, alla fronte in vicinanza dei sopraccigli, intorno e al disotto delle altre cicatrici.

18 marzo. Assente per edema locale.

19 marzo, ore 0.30. Primi sintomi di rabbia confermata.

19 marzo, ore 12. I dolori alle ferite di sinistra e alla periferia di esse sono più intensi e ad intervalli più brevi. La bambina ha desiderio di bere ma non vi riesce perchè appena ingoiata l'acqua si desta spasmo faringeo nausea, vomiturazione e vomito. Per la paura di tali disturbi ricusa di prendere qualunque cibo o liquido e solo talvolta riesce ad ingoiare un sorso d'acqua o vino.

Lingua impatinata, saburrale. La bambina discorre tranquilla e resta calma. Si eccita soltanto nel vedere i preparativi per farle l'iniezione, e dice non volerle alla testa in caso contrario minaccia di mordere tutti; fa tentativi di mordere la biancheria ed altri oggetti che le stanno vicini.

S'iniettarono d'emulsione fatta con 2 cm. di M_1 in 4 cmc. d'acqua distillata salata sterilizzata, 1 cmc. intorno alla ferita della guancia sinistra; 1 cmc. intorno alla ferita dell'angolo esterno del sopracciglio sinistro; 2 cmc. intorno alla ferita semilunare temporo-parietale sinistra. Impacco come sempre con garza bollita.

Immediatamente dopo le iniezioni alla testa, la bambina domanda da bere e beve facilmente una discreta quantità di acqua e vino senza avvertire alcun disturbo.

19 marzo, ore 18. La bambina è loquace. Avverte pochi dolori alla testa; leggera rachialgia specie alla pressione sulle apofisi spinose lombo-sacrali.

Movimenti degli arti integri; orinazione e defecazione normali. Lo spasmo faringeo è aumentato alla vista dell'acqua.

Eseguii una puntura alla Quincke colla più scrupolosa asepsi.

Per reggere la bambina nella dovuta posizione si vuol coprire la faccia ma essa grida che vuol mordere e vi tenta infatti finchè non si lascia scoperta.

Scelsi lo spazio interspinoso corrispondente immediatamente al disopra dell'orizzontale tirata fra le due spine iliache superiori posteriori. Infissi l'ago qualche mm. a sinistra della linea mediana e lo diressi in alto e verso la linea mediana; mi servii di un ago sterilizzato da siringa per iniezione di calomelano in sospensione.

Venne fuori del liquido cefalo rachidiano a gocce con pochissima pressione, limpidissimo come l'acqua. Ne estrassi 3 cmc. e lo raccolsi in una provetta sterilizzata.

Iniettai immediatamente 3 cmc. d'emulsione di M_1. L'emulsione era stata preparata circa mezz'ora prima all'Istituto con 2 cm. di midollo emulsionato in 20 cmc. d'acqua salata sterilizzata e lasciata depositare per circa 5 minuti decantandone poi in una provetta sterilizzata 10 cmc. della parte superiore. Prima d'iniettare il liquido fu agitata la provetta e lasciata depositare per circa 3 minuti.

Il liquido penetrò facilmente e non dette alcun disturbo alla bambina.

20 marzo, ore 14. La bambina non presentò disturbi di sorta nè respiratorii nè cardiaci, nè urinari nè di defecazione, nè degli arti movendosi bene in tutti i sensi nel suo lettino.

Intelligenza integra; ricorda tutto; assai loquace.

Aumentato il senso di oppressione e la difficoltà a deglutire. Non solo non può bere ma neppure vedere l'acqua, nè sentire il rumore di essa cadente da una fontanella esistente nella camera e lontana oltre tre metri.

Non può vedere i corpi lucidi nè la biancheria bianca sul letto, nè la luce troppo viva. Tutto ciò desta degli accessi di oppressione.

Se si soffia sul viso mentre sta tranquilla, di botto salta in mezzo al letto, si agita, porta la mano in gola, grida che si sente soffocare e che la si lasci stare.

Nel veder me dice di non volere le iniezioni alla testa, ma all'addome o alla spina dandole meno fastidii.

2ª puntura alla Quincke. Questa volta è più docile, non tenta di mordere e solo domanda che non si cuopra nè si regga la faccia sentendosi altrimenti soffocare.

La puntura è fatta nello stesso spazio interspinoso, ma a destra della

linea mediana. Estrassi 11 cmc di liquido cefalo-rachidiano venuto limpido come nella prima volta, a gocce e senza pressione, ed iniettai 10 cmc. di emulsione di M_1 fatta come sopra.

Nessun disturbo per tale iniezione.

21 marzo. Sintomi rabbici aumentati. Agitazione, delirio, perdita della vista.

22 marzo, ore 0.30. Morte.

Con ambedue i liquidi cefalo-rachidiani estratti colle due punture alla Quincke inoculai dei conigli sotto la dura madre e nel peritoneo. Tutti gli animali tenuti in osservazione per oltre un anno, stettero sempre benissimo.

IV. — Inefficacia della cura a malattia sviluppata.

Nella rabbia sviluppata, oltre al surriferito caso, eseguimmo la cura Pasteur altre cinque volte. In tre casi le iniezioni furono soltanto sottocutanee, in due, sottocutanee ed endovenose. Le iniezioni furono cominciate ai primi indizi e proseguite per due giorni e mezzo e due volte per quattro giorni; furono sempre iniettati i midolli più virulenti in gran quantità e più volte al giorno. Il risultato fu sempre negativo nè vi fu alcun accenno a qualsiasi tregua.

La durata del male fu in questi casi come in quelli nei quali non fu fatta alcuna cura, costantemente di tre giorni, meno in due casi che fu di cinque giorni.

Si ebbe sempre la stessa forma clinica: spasmo faringeo, aerofobia, idrofobia, delirio più o meno furioso; *e spesso prima della morte cecità di un occhio e poi dell'altro.*

In due casi si ebbe, nei primi due giorni, eccessiva affettività. Uno di questi, un bambino, voleva baciare parenti, dottori, assistenti e chiunque gli era vicino.

In quattro casi si ebbe decisa tendenza a mordere. Tre di questi mordevano la biancheria, gli oggetti vicini e minacciavano di mordere le persone, senza farlo. Il quarto però produsse delle gravi ferite a un suo figlietto.

È un tale G.... F...., di anni 31, da Pescasseroli (Aquila), morsicato gravemente al naso e alla guancia, il 12 ottobre 1900, da un cane girovago. Iniziò la cura al quarto giorno dalla morsicatura e la proseguì per 41 giorni. Dopo quattro giorni dal termine della cura, nel suo paese nativo, cominciò ad avvertire i primi sintomi della malattia sviluppata, sintomi che si sono accentuati nei giorni successivi, fino alla morte avvenuta al terzo giorno, dopo aver avuto sintomi furiosi gravissimi. Voleva la moglie e il figlio per morderli e l'invitava presso lui con la scusa di baciarli. La moglie, impaurita, riuscì a fuggire. I parenti, per compassione, gli presentarono il figlietto di mesi otto, credendo sul serio volesse baciarlo, ma invece lo mordè, producendogli una grave ferita di tre centimetri sul pomello sinistro. Morì due ore dopo.

Alla mamma e alla sorella che gli dichiaravano voler morire con lui, rispondeva che non dovevano morire, che non avessero paura perchè non avrebbe fatto loro alcun male.

Infatti, in tutta l'assistenza fattagli da vicino da costoro non provò mai di avventarsi, anche nei momenti furiosi. Interrogato perchè voleva mordere la moglie e il figlio, rispondeva che, essendo poveri senza il suo aiuto, non voleva sopravvivessero per soffrire; desiderava quindi facessero la sua stessa morte.

Terribile e crudele desiderio sentimentale ed egoistico!

PARTE SECONDA.

I. — Statistica.

Le persone morsicate, che subirono le vaccinazioni antirabbiche nel nostro Istituto dal settembre 1889 a tutto il 1902, furono 1940.

Le persone rimandate, perchè per esse non fu ritenuta necessaria la cura, furono 364. È da notare però che di queste la registrazione è cominciata soltanto dal 1897.

Distribuzione per anni, provenienza e mesi.

Ecco la distribuzione per anno:

Tabella II.

Anni	Persone curate	Persone rimandate
1889	11	..
1890	47	..
1891	58	..
1892	77	..
1893	108	..
1894	111	..
1895	100	..
1896	178	..
1897	225	51
1898	202	53
1899	145	49
1900	202	43
1901	142	77
1902	334	91
Totale . . .	**1940**	**364**

Segue la distribuzione per provincia di provenienza, divisa per chiarezza in due quadri, l'uno delle persone curate, l'altro di quelle rimandate.

TABELLA III. — *Persone curate. Distribuzione per provenienza.*

PROVINCE	1889	1890	1891	1892	1893	1894	1895	1896	1897	1898	1899	1900	1901	1902	Totale
Roma (città)	6	28	36	54	37	12	19	15	73	67	28	39	29	63	506
Roma (provincia)	5	13	18	6	38	37	13	48	56	55	53	57	59	64	522
Ancona	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	2
Aquila	..	..	..	..	..	..	3	6	3	2	7	8	1	6	36
Arezzo	..	3	..	..	2	5	11	9	6	26	8	3	3	7	83
Ascoli Piceno	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	4	1	7	13
Avellino	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	1
Bari	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	2	2
Cagliari	..	..	..	..	..	..	..	2	..	1	..	.	..	..	3
Campobasso	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	1
Caserta	..	..	..	..	..	3	5	..	10	..	4	7	2	9	40
Catanzaro	..	..	..	..	..	.	..	..	..	..	..	..	..	1	1
Chieti	..	..	..	..	..	..	..	2	10	1	6	2	..	14	35
Cuneo	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1

Segue TABELLA III. — *Persone curate. Distribuzione per provenienza.*

PROVINCE	1889	1890	1891	1892	1893	1894	1895	1896	1897	1898	1899	1900	1901	1902	Totale
Firenze	..	..	..	..	..	..	..	4	..	1	..	..	..	4	9
Grosseto	..	..	..	..	1	..	..	2	..	1	..	..	..	..	4
Lecce	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1	1
Macerata	..	..	..	1	..	1	4	1	..	1	10	23	6	27	74
Perugia	..	3	1	13	18	44	31	55	33	31	16	28	22	103	398
Pesaro-Urbino	..	..	..	..	..	..	..	7	5	..	1	3	..	1	17
Pisa	..	..	..	..	1	..	..	..	..	1	..	..	..	..	2
Ravenna	..	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	1
Reggio Calabria	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	1
Sassari	..	..	..	1	1	..	..	4	10	1	5	7	4	..	33
Siena	..	..	2	1	2	4	11	6	5	3	7	4	..	3	48
Teramo	..	..	1	..	6	5	3	15	13	11	..	17	13	22	106
	11	**47**	**58**	**77**	**108**	**111**	**100**	**178**	**225**	**202**	**145**	**202**	**142**	**334**	**1 940**

TABELLA IV. — *Persone rimandate.*

PROVINCE	1897	1898	1899	1900	1901	1902	Totale
Roma (città). . .	44	48	33	36	63	88	312
Roma (provincia) .	2	4	9	6	7	2	30
Aquila	1	..	1	..	..	..	2
Ascoli Piceno . .	..	..	..	..	3	..	3
Caserta.	..	..	..	1	..	..	1
Macerata	..	..	1	..	..	..	1
Perugia.	4	1	3	..	..	..	8
Pesaro-Urbino . .	..	..	1	..	..	..	1
Siena.	..	..	1	..	..	1	2
Teramo.	..	..	..	..	4	..	4
	51	**53**	**49**	**43**	**77**	**91**	**364**

L'aumento progressivo dei primi anni è dovuto alla graduale conoscenza avuta dal pubblico e dalle autorità dell'esistenza del nostro Istituto.

Le oscillazioni in aumento o in diminuzione avvenute dal 1896 al 1901, sono legate a variazioni di contributo, in massima parte, della città di Roma e delle provincie di Perugia, Teramo e Macerata. Il contributo della provincia di Roma è stato quasi costante, con leggerissimo, ma progressivo aumento, sino al 1902. In questo anno abbiamo avuto un accentuato aumento di morsicati forniti anche dalla città di Roma, dalle provincie di Maccrata e Teramo e per un terzo circa del totale dalla provincia di Perugia, nella quale, specialmente dall'agosto al dicembre, si ebbero molti cani idrofobi riconosciuti tali sperimentalmente, in parte nel nostro Istituto, in parte nel Laboratorio batteriologico di Perugia.

Detta provincia fornisce ciascun anno al nostro Istituto, dopo Roma città e provincia, il maggior numero di morsicati.

Non v'è dubbio che i sopraccennati aumenti, più o meno notabili delle persone morsicate, curate e rimandate, furono dovuti alla maggiore o minore rilassatezza d'applicazione dei regolamenti per cui vi

fu negli ultimi anni, specialmente nel 1902, un aumento della rabbia canina.

Pel desiderio di vedere assai diminuite, se non estinte, le morsicature d'animali idrofobi, affinchè fosse così debellata la rabbia umana, esprimo un mio augurio, che cioè, *le autorità competenti terranno presente le fatali conseguenze di alcune morsicature e faranno osservare, costantemente, col massimo rigore, i regolamenti sulla custodia dei cani in qualsiasi luogo pubblico di città o campagna.*

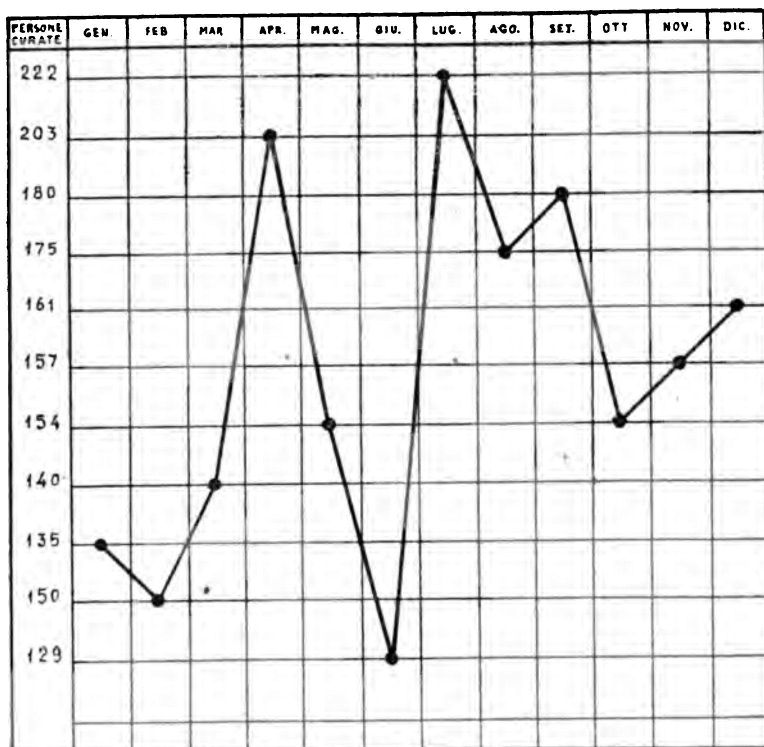
Ripartendo le persone curate per i mesi di ciascun anno, come nel quadro seguente:

TABELLA V. — *Persone curate. Distribuzione secondo i mesi di ciascun anno.*

ANNI	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre	Totale
1889	.	..	..	..	..	..	..	..	1	2	5	3	11
1890	6	5	4	5	5	..	5	7	2	4	3	1	47
1891	5	..	1	7	10	8	9	2	2	5	6	3	58
1892	2	5	3	1	3	9	17	8	11	8	2	8	77
1893	6	11	19	14	12	5	5	8	7	9	10	2	108
1894	3	11	12	18	7	5	13	7	8	15	3	9	111
1895	14	9	5	10	8	8	16	7	4	6	6	7	100
1896	10	10	19	8	11	12	23	7	16	14	27	21	178
1897	7	11	12	37	8	31	29	14	21	18	20	17	225
1898	26	18	16	24	19	9	25	10	19	12	10	14	202
1899	17	14	7	6	14	15	14	12	18	5	9	14	145
1900	15	13	16	35	16	8	25	23	19	7	13	12	202
1901	10	5	12	14	22	7	18	14	10	15	8	7	142
1902	14	18	14	24	19	12	23	56	42	34	35	43	334
	135	**130**	**140**	**203**	**154**	**129**	**222**	**175**	**180**	**154**	**157**	**161**	**1940**

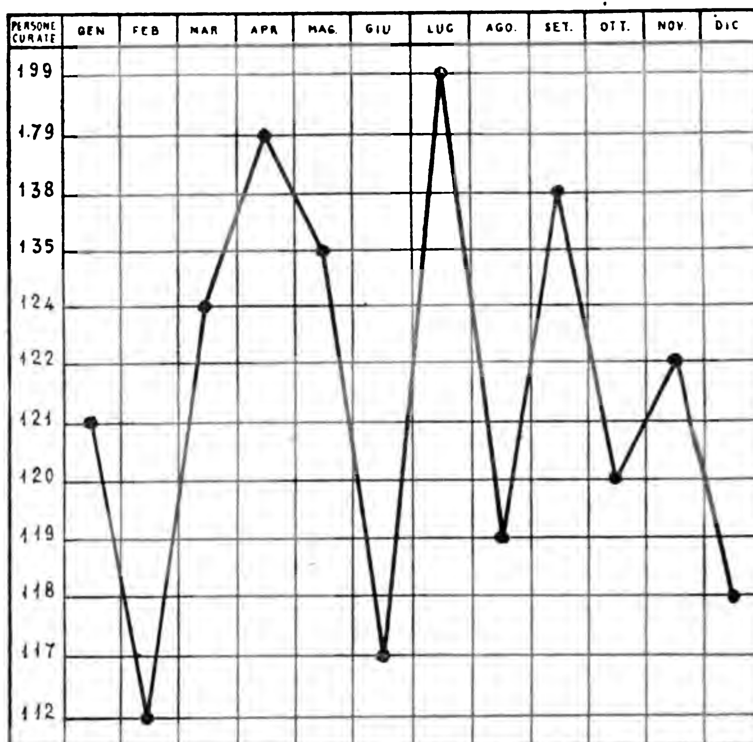
troviamo variazioni tanto incostanti da non poter stabilire alcuna norma d'aumento o diminuzione della rabbia nei singoli mesi e nelle singole stagioni.

Sommando però i curati di tutti gli anni nei singoli mesi, e disponendo le cifre in graduazione, come qui appresso, formando un quadro grafico:



possiamo notare *che la rabbia crebbe maggiormente nel luglio, aprile e settembre, diminuì nel giugno e febbraio e fu eguale nel maggio e ottobre. Si ebbe il massimo nel luglio ed il minimo nel giugno.*

Questi dati hanno una certa costanza nella nostra statistica. Difatti, dal quadro grafico che avevamo preparato per la statistica fino a tutto il 1901 e che mi piace qui riportare:



risultano i massimi in luglio, aprile e settembre; i minimi in febbraio e giugno.

La rabbia quindi andrebbe crescendo dal febbraio all'aprile, da questo andrebbe diminuendo sino al giugno. Dal minimo di giugno salirebbe rapidamente al massimo di luglio; diminuirebbe mantenendosi abbastanza alta nell'agosto per risalire nel settembre; indi diminuirebbe nell'ottobre per risalire nel novembre e dicembre. Dal dicembre discenderebbe sino al febbraio.

Riguardo alle stagioni la rabbia sarebbe in aumento nell'estate. nella primavera e autunno, sarebbe oscillante e in diminuzione nell'inverno. Nell'estate si avrebbe il massimo nel primo mese, diminuirebbe nel secondo e risalirebbe nel terzo.

Nella primavera aumenterebbe nel primo mese per diminuire poscia nel secondo e terzo.

Nell'autunno invece si avrebbe aumento costante nel secondo mese, diminuzione costante nel primo e oscillazione ora d'aumento, ora di diminuzione nel terzo.

Questi dati possono dirsi sempre costanti e possono essi generalizzarsi? Ne dubito.

La nostra statistica confermerebbe l'opinione generale, che la rabbia è più sviluppata nell'estate, concorderebbe con la statistica francese del 1890, nel rilevare un forte aumento nel principio della primavera, ma discorderebbe da questa riguardo al massimo della fine d'inverno e alla diminuzione della rabbia nel luglio (1). Dalla statistica dell'Istituto Pasteur del 1893, risulta esservi un periodo di massimo alla primavera ed un periodo di minimo all'autunno (2). Ma neppur questo accorda coi nostri risultati.

Nella stazione antirabbica di Palermo su 5361 morsicati dall'anno 1887 al 1901, se n'ebbero 104 in inverno, 22 in primavera, 81 in estate e 80 in autunno.

A Bologna invece si ebbe di vaccinati il massimo in primavera, meno in estate e autunno e il minimo nell'inverno.

II. — Animali morsicatori.

Gli animali morsicatori furono in ordine di maggiore frequenza cani (3). gatti, maiali, cavalli, bovi, asini, cavie, conigli, lupo, mulo, volpe, pecora, capra, scimmia, ratto bianco e riccio.

I casi di morsicatura di persone rabbiose sono rare. Ne cita un un caso il dott. Pampoukis, direttore dell'Istituto ellenico d'Atene (4). Un bambino fu morso da un cane e fu preso da rabbia; morse il padre al braccio e morì il dì seguente. Il padre si assoggettò alla cura e visse.

In 13 anni noi avemmo un sol caso evidente di morsicatura da persona idrofoba.

Un uomo adulto, morsicato da un cane girovago, ammalò di rabbia furiosa la sera del 29 novembre 1900 e morì il 2 dicembre 1900 alle ore 20 (5). Voleva mordere la moglie e il figlio e due ore prima della morte ottenuto il figlio di mesi 8 per baciarlo, lo morsicò sul pomello sinistro producendogli due fori con ecchimosi circostante circolare del diametro di cm. 3. Il bambino dopo 10 giorni dalla morsicatura iniziò una lunga cura intensiva e stette sempre bene.

(1) Annales de l'Institut Pasteur, 1890, pag. 147.
(2) Annales de l'Institut Pasteur, 1893, pag. 341.
(3) Uno di questi cani morsicatori fu affetto da rabbia consuntiva riconfermata sperimentalmente. Tale forma clinica di rabbia fu da noi descritta in questi Annali. Roma, 1892.
(4) Annales de l'Institut Pasteur, 1900, pag. 111.
(5) Vedi pag. 638.

Furono inviate al nostro Istituto per accertare o no la diagnosi di rabbia, 7 cervelli d'uomini e 942 teste di animali. Di questi 842 furono cani, 77 gatti, 4 maiali, 3 cavalli, 3 bovi, 2 asini, 2 cavie, 2 conigli, 1 mulo, 1 volpe, 1 pecora, 1 capra, 1 scimmia, 1 ratto bianco, 1 riccio.

Riguardo all'esito si ebbero 624 risultati positivi, 81 negativi e 244 dubbi. Fra questi dubbi furono compresi 99 teste giunte putrefatte, per le quali l'esito fu nullo o non fu eseguito l'esperimento. 95 volte fu inviato il cervello, o il midollo, o l'intera testa in glicerina neutra e l'esperimento riuscì sempre bene.

Due teste ci giunsero immerse in alcool comune e l'immersione datava da tre giorni; in un caso si ebbe risultato positivo con inizio del male al 15° giorno dall'inoculazione e morte al 16° giorno; nell'altro i conigli d'esperimento sopravvissero.

Due volte ci giunse il cervello dell'animale immerso in alcool comune da oltre 48 ore. Il cervello fu lavato in molta acqua sterilizzata e poscia, spaccato, fu preso dalla parte centrale un piccolo frammento per l'emulsione. In un caso l'esito fu positivo con inizio del male al 35° giorno dall'inoculazione e morte al 37° giorno; nell'altro i conigli d'esperimento sopravvissero.

Un cervello ci giunse in soluzione fenicata, di cui non si conobbe il titolo: furono fatte le sopradette precauzioni, ma gli animali d'esperimento sopravvissero.

Una testa ci giunse in forte soluzione fenica di titolo ignoto. L'esperimento riuscì positivo e gli animali si ammalarono al 15° giorno dall'inoculazione e morirono al 17° giorno.

Gli esperimenti furono sempre eseguiti con iniezioni sottodurali d'emulsione di midollo spinale o cervello in acqua distillata al 0.5 per cento sterilizzata.

III. — Mortalità.

Ripartiamo ora le persone curate in rapporto alla rabbia dell'animale e alla sede, entità e cauterizzazione delle morsicature per dedurne in ultimo con precisione la mortalità.

Le persone curate furono divise in 4 categorie *A*, *B*, *C*, *D*; la prima *A*, comprende le persone morsicate da animali constatati rabbiosi o dalle esperienze fatte in laboratorio o dalla morte per rabbia di persone o di animali morsicati contemporaneamente; la seconda *B*

comprende le persone morsicate da animali, la rabbia dei quali fu provata da sintomi clinici evidenti della malattia o da certificati di medici o veterinari; la terza *C*, comprende le persone morsicate da animali, la rabbia dei quali resta dubbia, perchè non si è potuto rintracciare l'animale, nè averne notizie, o perchè ucciso non si è potuto eseguire l'esperimento; la quarta *D*, comprende le persone morsicate da animali che, in seguito, risultarono non malati di rabbia.

Accade talvolta che persone morsicate leggermente o gravemente da animali sospetti si presentino all'Istituto per essere ammesse alla cura e nel dubbio la si fanno cominciare subito. Più tardi gli animali morsicatori son riconosciuti non rabbiosi e le persone morsicate, in cura, la sospendono se non l'avevano di già completata.

Per esattezza della statistica non è giusto che tali curati aumentino la categoria *C*, e il totale dei curati con diminuzione sicura della percentualità. Perciò ho creduto farne una categoria a parte, la quale servirà d'altronde a confermare sempre più all'evidenza l'innocuità della cura. Di tale categoria però ne farò cenno soltanto nei primi quadri generali statistici; in seguito, per maggior chiarezza e semplicità, la sopprimerò defalcando sempre dalle rispettive cifre il numero dei curati contenuto in essa.

Riguardo alla sede delle ferite ho fatto tre gruppi, cioè dei morsicati alla testa e faccia, alle mani, e alle membra e tronco. Le morsicature alla testa, faccia, e mani furono tutte a nudo.

I morsicati al polso se a nudo li ho registrati fra i morsicati alle mani, se al coperto fra quelli del tronco e membra.

I morsicati in varie parti del corpo li ho segnati nella sede maggiormente ferita e più grave.

Nei tre quadri seguenti riporto i curati divisi in tali gruppi e secondo le categorie, il numero delle morsicature, cioè se semplici o multiple pei due primi gruppi e le cauterizzazioni.

Ho compreso fra le cauterizzazioni immediate quelle fatte nello spazio di tempo inferiore ad un'ora, tardive quelle da un'ora in poi. Siccome queste furono tutte o incomplete o superficialissime o fatte dopo molti giorni o con agenti inefficaci, per semplicità di statistica le ho riunite alle nulle.

TABELLA VI.

Persone morsicate alla testa e alla faccia

Categoria	Morsicature: semplici	Morsicature: multiple	Cauterizzazioni: immediate	Cauterizzazioni: tardive o nulle	Num. delle persone curate.	Morti
A	21	54	12	63	75	6
B	13	34	4	43	47	3
C	3	2	1	4	5	..
D	1	3	2	2	4	..
Totale . .	**38**	**93**	**19**	**112**	**131**	**9**

Persone morsicate alle mani

Categoria	Morsicature: semplici	Morsicature: multiple	Cauterizzazioni: immediate	Cauterizzazioni: tardive o nulle	Num. delle persone curate	Morti
A	223	349	103	469	572	4
B	99	208	38	269	307	5
C	16	26	8	34	42	..
D	13	18	11	20	31	..
Totale . .	**351**	**601**	**160**	**792**	**952**	**9**

Persone morsicate alle membra e al tronco

Categoria	Morsicature: a nudo	Morsicature: al coperto	Cauterizzazioni: immediate	Cauterizzazioni: tardive o nulle	Num. delle persone curate	Morti
A	79	382	112	349	461	2
B	51	261	51	261	312	1
C	9	65	17	57	74	..
D	2	8	2	8	10	..
Totale . .	**141**	**716**	**182**	**675**	**857**	**3**

La statistica pura (contenente cioè tutti i morti in qualsiasi epoca di cura) per ciascun anno e in totalità sarebbe la seguente:

Tabella VII.

ANNI	Numero delle persone curate	Morti	Mortalità %
1889	11	..	..
1890	47	1	2.12
1891	58	2	3.44
1892	77	..	..
1893	108	2	1.85
1894	111	2	1.80
1895	100	..	..
1896	178	2	1.12
1897	225	1	0.44
1898	202	3	1.48
1899	145	..	..
1900	202	3	1.48
1901	142	1	0.70
1902	334	4	1.19
Totali . . .	**1940**	**21**	**1.08**

La giusta modificazione Perdrix accettata dall'Istituto Pasteur e da tutti gli altri Istituti, cioè di non calcolare i morti durante la cura e nei primi 15 giorni dal termine di essa mi avrebbe fatto assai buon giuoco. Secondo essa avrei dovuto escludere dalla statistica tutti i morti, giacchè nel nostro Istituto da vari anni la cura è resa molto lunga specialmente nei casi gravi.

Ora mentre è giustissimo di non addebitare ad insuccesso della cura coloro i sintomi rabbici dei quali son cominciati nei primi giorni del trattamento curativo non sarebbe altrettanto per quelli, che hanno già subìto un discreto numero di giorni di cura intensiva.

Tenendo conto che bisognano almeno 20 giorni di cura, perchè l'immunità possa apparire e altri 15 giorni son necessari perchè si produca l'effetto delle successive ed ultime inoculazioni, ho divisa la mortalità così: *morti nei primi 20 giorni di cura* e corrispondono ai morti durante la cura tenuto anche conto che la durata di questa era ed è ancora in media in molti Istituti di 20 giorni: *morti dai 21 ai 35 giorni* e corrispondono ai morti durante i primi 15 giorni dal termine della cura e *morti dopo i 35 giorni di cura* e corrispondono ai morti dopo i primi 15 giorni dal termine di essa.

In tal modo è soltanto variata la dicitura, ma v'è l'uniformità colle altre statistiche congeneri.

Nel seguente quadro son distribuiti i morti in ciascun anno secondo la sopraesposta divisione:

TABELLA VIII.

ANNI	Numero delle persone curate	Morti nei primi 20 giorni di cura	Morti dai 21 ai 35 giorni di cura	Morti dopo i 35 giorni di cura
1889	11	..	..	..
1890	47	..	..	1
1891	58	1	..	1
1892	77	..	..	..
1893	108	..	..	2
1894	111	..	2	..
1895	100	..	..	..
1896	178	2	..	..
1897	225	1	..	..
1898	202	1	1	1
1899	145	..	..	..
1900	202	..	2	1
1901	142	..	1	..
1902	334	2	1	1
Totali	1 940	7	7	7

Per attuare quindi la modifica Perdrix nei limiti osservati dall'Istituto Pasteur e da tutti gli altri Istituti, dobbiamo togliere, dal totale dei curati e dei morti, le persone curate e morte nei primi 35 giorni di cura, cioè 14. E togliendo anche i 45 curati della categoria *D*, avremo il seguente quadro:

TABELLA IX.

ANNI	Numero delle persone curate	Morti	Mortalità %
1889	9	..	..
1890	45	1	2.22
1891	48	1	2.08
1892	75	..	..
1893	103	2	1.94
1894	109	..	..
1895	97	..	..
1896	176	..	..
1897	222	..	..
1898	191	1	0.52
1899	144	..	..
1900	197	1	0.51
1901	139	..	..
1902	326	1	0.31
Totali . . .	**1 881**	**7**	**0.37**

Calcolando ora tale mortalità a seconda le varie categorie e le sedi delle morsicature, si ha:

TABELLA X.

CATEGORIA	Morsicature alla testa e faccia			Morsicature alle mani			Morsicature alle membra e al tronco			Totale		
	Curati	Morti	Per %	Curati	Morti	Per %	Curati	Morti	Per %	Curati	Morti	Per %
A	69	..	..	570	2	0.35	459	..	..	1098	2	0.18
B	46	2	4.35	305	3	0.98	311	..	..	662	5	0.76
C	5	..	..	42	..	..	74	..	..	121	..	..
Totali . . .	**120**	**2**	**1.67**	**917**	**5**	**0.55**	**844**	..	..	**1881**	**7**	**0.37**
A-B	115	2	1.74	875	5	0.57	770	..	..	1760	7	0.40

Nei due seguenti quadri è registrata la mortalità, per le due categorie *A-B* complessivamente, rispetto alle morsicature semplici o multiple, a nudo o al coperto, cauterizzate o no.

TABELLA XI. — *Categoria A-B.*

SEDE DELLE MORSICATURE	Morsicature semplici	Morti	Per %	Morsicature multiple	Morti	Per %	Morsicature a nudo	Morti	Per %	Morsicature al coperto	Morti	Per %
Alla testa e faccia.	33	..	..	82	2	2.44	..	..	..	..	..	..
Alle mani	321	..	..	554	5	0.90	..	..	..	..	..	..
Alle membra e al tronco . . .	..	..	..	..	.	..	127	..	..	643	..	..
Totale . . .	**354**	..	..	**636**	**7**	**1.10**	**127**	..	..	**643**	..	..

TABELLA XII. — *Categoria A-B.* — *Cauterizzazioni.*

SEDE delle morsicature	Cauterizzate immediatamente	Morti	Per %	Cauterizzate tardi o non cauterizzate	Morti	Per %
					t. n.	
Alla testa e faccia . . .	16	1	6. 24	99	1	1. 01
Alle mani	140	1	0. 71	735	2 + 2	0. 54
Alle membra e al tronco.	162	..	..	608	..	..
Totale . . .	**318**	**2**	**0. 63**	**1 442**	**2 + 3**	**0. 35**

Su 1881 persone curate abbiamo avuto dunque 7 morti, cioè mortalità per cento 0. 37.

Su 1098 della categoria *A*, 2 morti, per cento 0. 18.

Su 662 della categoria *B*, 5 morti, per cento 0. 76.

Su 1760 della categoria *A* + *B*, 7 morti, per cento 0. 40.

Nessun morto nella categoria *C*.

Su 115 della categoria *A* + *B*, delle morsicature alla testa e faccia, 2 morti, per cento 1. 74.

Su 875 alle mani, 5 morti, per cento 0. 57.

Su 770 alle membra e tronco, 0 morti.

Su 636 morsicature multiple, 7 morti, per cento 1. 10.

Su 354 morsicature semplici, 0 morti.

Le nostre medie di mortalità per cento sono delle migliori; sono più basse che quelle di molti Istituti e corrispondono alle minime di altri.

Secondo me, però, per non lasciar posto a qualsiasi critica, si dovrebbero escludere dalla mortalità soltanto i morti nei primi 20 giorni di cura, o poco più. Oggi che la cura si fa così rapidamente intensiva, in detto spazio di tempo si è già fatto tale numero d' iniezioni, anche con midolli forti, da supporre che l' immunizzazione dovrebbe già essere bene avviata e impedire l' insuccesso, a meno di casi assolutamente refrattarii.

Perciò nei quadri seguenti, che rappresentano la statistica, secondo il nostro concetto, sono esclusi soltanto i morti nei primi

20 giorni di cura. Fra questi v'è compreso uno, in cui lo sviluppo della malattia è cominciato al ventiduesimo giorno di cura.

Siccome la categoria *C* racchiude casi semplici, e in essa non v'è registrato alcun morto, così nelle ultime due tabelle e nelle deduzioni ho tenuto conto soltanto delle due categorie *A-B* riunite insieme, le quali contengono, quasi alla pari, i casi più gravi.

In tal modo i risultati sono più chiari ed evidenti, ed acquistano maggior valore in forza del grande rigore con cui è stata condotta la statistica.

TABELLA XIII. — *Statistica, esclusi i soli morti nei primi 20 giorni.*

CATEGORIA	Morsicature alla testa e faccia			Morsicature alle mani			Morsicature alle membra e al tronco			Totale		
	Curati	Morti	Per °/₀	Curati	Morti	Per °/₀	Curati	Morti	Per °/₀	Curati	Morti	Per °/₀
A.	72	3	4.16	572	4	0.70	460	1	0.22	1 104	8	0.72
B.	47	3	6.38	305	3	0.98	311	..	..	663	6	0.90
C.	5	..	..	42	..	..	74	..	..	121	..	..
Totale . . .	**124**	**6**	**4.84**	**919**	**7**	**0.76**	**845**	**1**	**0.12**	**1 888**	**14**	**0.74**
A-B	119	6	5.04	877	7	0.80	771	1	0 13	1 767	14	0.79

Tabella XIV. — *Categoria A-B.* — ***Morsicature varie.***

SEDE DELLE MORSICATURE	Morsicature semplici	Morti	Per °/°	Morsicature multiple	Morti	Per °/°	Morsicature a nudo	Morti	Per °/°	Morsicature al coperto	Morti	Per °/°
Alla testa e faccia	33	..	..	86	6	6.98	..	..	..	..	..	..
Alle mani	322	1	0.31	555	6	1.08	..	..	..	..	..	..
Alle membra e al tronco . . .	..	..	..	..	..	..	128	1	..	643	..	..
Totale . . .	**355**	**1**	**0.28**	**641**	**12**	**1.87**	**128**	**1**	**0.78**	**643**	..	..

TABELLA XV. — *Categoria A-B.* — *Cauterizzazioni.*

SEDE delle morsicature	Cauterizzate immediatamente	Morti	Per %	Cauterizzate tardi o non cauterizzate	Morti	Per %
					t. n.	
Alla testa e faccia. . .	16	1	6.25	103	2+3	4.85
Alle mani	141	2	1.41	736	2+3	0.68
Alle membra e al tronco.	162	..	..	609	1	0.16
Totali . . .	**319**	**3**	**0,94**	**1448**	**5+6**	**0.76**

Confrontando le sovraesposte tabelle con le tabelle X, XI, XII, si hanno le seguenti sensibili differenze in più sulla percentuale:

La mortalità totale (parlando sempre ed esclusivamente delle categorie *A-B*) . . . . da 0.40 sale a 0.79
La mortalità delle morsicature alla testa e faccia » 1.74 » » 5.04
La mortalità delle morsicature alle mani . » 0.57 » » 0.80
La mortalità delle morsicature alle membra e tronco . . . . » 0 » » 0.13
La mortalità delle morsicature multiple . . » 1.10 » » 1.87
La mortalità delle morsicature semplici . . » 0 » » 0.28
La mortalità delle morsicature a nudo . . » 0 » » 0.78
Le morsicature delle parti coperte rimangono eguali, cioè mortalità 0 per %.
La mortalità delle morsicature cauterizzate immediatamente . . . . » 0.63 » » 0.94
La mortalità delle morsicature cauterizzate tardi o non cauterizzate . . . . » 0.35 » » 0.76

Dall'esame delle cifre della nostra statistica rileviamo che, quantunque seguendo i nostri criteri, la mortalità percentuale divenga più alta, i risultati rimangono sempre assai confortanti.

Difatti, una mortalità 0.79 per 100 sopra 1767 curati delle categorie* A + B *è certamente una percentuale punto elevata e conferma i successi della cura antirabbica.

La mortalità delle morsicature alla testa e faccia è relativamente alta. È sperabile però che anche questa col tempo diminuirà assai, quando cioè i morsicati, *sapendo che le morsicature alla testa e faccia, quelle alle mani, le morsicature multiple e quelle a nudo, sono sempre gravi e costituiscono un pericolo più o meno immediato*, si presenteranno alla cura al più presto possibile dopo le morsicature, e si potrà su di essi instituire subito una cura lunga, ma rapidamente ed energicamente intensiva.

Esaminando infine le tabelle XII e XV notiamo che la mortalità delle morsicature cauterizzate immediatamente è più elevata di quelle cauterizzate tardi o non cauterizzate. Questo aumento, che può attribuirsi alla maggiore frequenza delle cauterizzazioni immediate nei casi più gravi, se non dimostra l'inutilità di esse, ne rileva per lo meno la poca utilità. E ciò dipende, in principal modo, dal perchè quasi tutte le cauterizzazioni sono fatte in modo insufficiente. Così poco si può contare su di esse. Con tutto ciò, non possiamo sconsigliare dal praticarle.

IV. — Conclusioni.

1° La cura antirabbica deve iniziarsi al più presto possibile e deve essere lunga, intensiva, e variabile a seconda gli individui e la gravità delle morsicature. Si può cominciare coi midolli di 9ª o 8ª giornata, intensificando così i vari cicli.

2° L'emulsione deve iniettarsi appena fatta, lasciando depositare soltanto le particelle più grosse.

3. La mortalità per °/₀ dei nostri curati delle categorie $A + B + C$, adoperando i comuni criteri delle statistiche degli Istituti antirabbici, fu 0.37; quella delle categorie $A + B$ fu 0.40. La mortalità per °/₀ dei nostri curati delle categorie $A + B + C$, usando il massimo rigore nella statistica, giusta il mio concetto, fu 0.74; quella delle categorie $A + B$ fu 0.79.

4° I dolori premonitori sul sito delle morsicature e loro dipendenze sono spesso i prodromi più o meno lontani dello svolgersi della rabbia. Al loro apparire, anche oltre un anno, i morsicati debbono ripresentarsi subito all'Istituto, dove fecero la cura.

5° L'apparire dei dolori premonitori indica che la cura finora

fatta fu insufficiente. Allora deve rendersi rapidamente intensiva o rifarsi in parte, anche più volte, se terminata.

In tali casi è bene che le iniezioni dei midolli forti siano fatte in tutto o in parte in corrispondenza delle morsicature e irradiazioni nevralgiche.

6° Nei casi gravissimi la cura per essere efficace deve essere intrapresa prestissimo, resa rapidamente intensiva e prolungata per molto tempo. Però vi sono tuttavia dei casi refrattari ad ogni cura meglio eseguita.

7° Il liquido cefalo-rachidiano raccolto durante la rabbia sviluppata ed inoculato nei conigli fu inattivo.

8° Le iniezioni endospinali fatte, durante lo sviluppo della rabbia. con abbondante emulsione di midollo virulentissimo, sono innocue, ma inefficaci.

9° Nella rabbia sviluppata la cura anche più intensa coi midolli più virulenti, con iniezioni sia sottocutanee, sia endovenose, ha dato sempre risultato negativo, e neppure alcuno accenno a qualsiasi tregua.

10° Instabile è la distribuzione della rabbia secondo i varî mesi e le varie stagioni.

11° L'uomo idrofobo raramente tende a mordere, rarissimamente morde, e nel nostro caso non ha trasmesso la rabbia.

12° Per debellare la rabbia umana le autorità competenti dovrebbero far osservare col massimo rigore, costantemente, i regolamenti sulla custodia dei cani, in qualsiasi luogo pubblico di città e campagna.

Istituto d'igiene della Regia Università di Roma

Sulla diagnosi differenziale di vari bacilli radicicoli in base ai caratteri morfologici e colturali.

Ricerche del dottor **LUIGI CHIARIZIA.**

È noto dagli studi di diversi autori che nelle radici delle papilionacee e delle leguminose, si formano dei noduli, i quali dànno ricetto ad un germe speciale capace di assimilare direttamente l'azoto dall'aria.

Questo germe si presenta in tali noduli con caratteri speciali, i quali sono stati descritti in molti trattati come per es. dal Fischer nelle sue *Vorlesungen über Bakterien* (1), così bene che io credo inutile farne una descrizione particolareggiata, preferendo riferire le parole dell'autore.

« I tubercoli sono addossati o lateralmente alla radice o sono congiunti mediante un piccolo fascettino ramoso con i fasci vascolari, ovvero aderiscono qua e là direttamente sul corpo della radice la quale è qua e là rigonfiata. In ambo i casi, le cellule dei tuberi che contengono i batteri, stanno in intima connessione con le vie di migrazione della materia delle leguminose. Nella sezione di un giovane tubero che compresso geme un succo latteo torbido, si notano subito delle grandi celle stipate, con un contenuto finamente striato, le quali ancor oggi, secondo l'antico costume, si sogliono designare col nome di tessuti batterioidi.

« Sovente sulla sezione dei tuberi sono disseminati parecchi nidi di queste cellule, che spesso si riuniscono a formare dei grossi conglomerati. Le cellule che non sono altro che quelle rigonfiate ed ingrandite delle radici delle leguminose, sono piene zeppe di fini ed agili bastoncini, la cui natura fu diversamente interpretata.

« Il primo osservatore, il Woronin, nel 1866 li ritenne per parti simili a batteri ed appartenenti ad un fungo indovato nei tuberi.

(1) Jena, 1897, S. 85.

Più tardi si interpetrarono come deposizioni cristalline di albumina non organizzate, e si chiamarono *batterioidi* a causa della loro somiglianza coi batteri.

« Se questo concetto era giusto, i tuberi non dovevano essere delle formazioni morbose, ma degli organi particolari delle leguminose, in certo qual modo, tubercoletti albuminoidi, in cui le sostanze albuminoidi, prodotte dall'azoto dell'aria, si depositavano sotto forma di batterioidi.

« Ora è sicuramente dimostrato, che batteri viventi riempiono le torbide cellette dei tubercoli; ma soltanto nei tubercoli giovani questi batteri sono agili e sani, uniformemente colorabili come gli altri batteri coi colori di anilina.

« Ben presto però essi assumono delle forme degenerative di ogni specie, rendendo ora l'immagine di un Y latino, vale a dire a tre branche, ora rigonfiandosi con aspetto fusiforme, ora in corpuscoli ovali con margini ottusi ed irregolari.

« Soltanto questi batteri degenerati prendono ora il nome di *batterioidi,* vale a dire sono forme di involuzione che i batteri viventi di ogni specie formano in condizioni sfavorevoli . . . . .

« Accanto alla deformazione esterna si manifesta una diminuzione del contenuto, spesso rimangono uno o pochi granuli colorabili, e spesso sembra come se non sia rimasta che una membrana vuotata, debolmente colorabile con colori di anilina.

« Insomma la trasformazione dei batteri in batterioidi è segno del loro perire da una parte, e dall'altra dell'utilizzamento fattone dalla leguminosa, che comincia a crescere più rigogliosamente appena i batterioidi compaiono.

« Quando matura il seme, i tubercoli, vuoti ed afflosciati. contengono, oltre moltissimi detriti di batterioidi, ancora un numero di bacilli sani intatti, i quali trapassano nel terreno come materiale di semina per l'anno successivo ».

Questo germe è stato coltivato dai vari autori che l'hanno studiato, ed in esso sono state messe in evidenza anche le sue proprietà biologiche, di guisachè, come risulta dalla descrizione che riferisce il Migula, avrebbe i seguenti caratteri (1).

Bastoncini grossi in media 0.9 micromillimetri e lunghi 3-4 micron, con estremità leggermente arrotondate, per lo più isolati, dotati di lenta mobilità, spesso addirittura immobili nelle colture artificiali. La morfologia e lo

(1) *System der Bakterien.* Bd. II. Jena, G. Fischer, 1900.

sviluppo di questa specie abbisogna ancora di molte spiegazioni, non ostante i molti lavori che si occupano di questo argomento.

Sulla gelatina ordinaria si sviluppano scarsamente. Nel miglior modo si coltivano in decozioni di parti di leguminose (gambi di piselli, ecc.), con aggiunta di adeguate quantità di gelatina. In questo terreno essi formano delle colonie abbastanza grandi, torbide, bianche, umide, rotondeggianti o con margini alquanto irregolari, di aspetto poco caratteristico, liscie e quasi prive di struttura.

La gelatina non è fluidificata.

Produce i tubercoli propriamente detti delle leguminose, nei quali soltanto i bastoncini si riproducono copiosamente, ma più tardi dànno origine a quelle particolari forme involutive che sono conosciute sotto il nome di batterioidi, e poi muoiono e rimangono come sostanze albuminoidi di riserva per la nutrizione della pianta.

Questa notevole sinbiosi fra batteri e leguminose conduce ad una considerevole assimiliazione dell'azoto atmosferico; tuttavia il processo non è ancora chiaro nei suoi particolari.

I bacilli che si sviluppano nei tubercoli appartengono verosimilmente tutti ad una specie, però hanno dato luogo a delle varietà ormai costanti, inquantochè i batteri dei tuberi del lupino, per esempio, non sono capaci di produrre tubercoli nel trifoglio incarnato, e viceversa.

Così pare che si siano stabilite moltissime varietà che si adattano solo a determinate specie di leguminose.

Artificialmente i batteri dei tubercoli si sono adoperati come *nitragino* per impregnare il terreno sterile allo scopo di ottenere un migliore accrescimento delle leguminose.

Per quanto questi batteri siano generalmente diffusi, pure vi è della terra (terreno paludoso), nel quale mancano, e in conseguenza di ciò, le leguminose che fino ad un certo punto hanno tendenza alla simbiosi, ivi crescono soltanto tristamente. Mediante il *nitragino* si è cercato di rimediare a questa sfavorevole condizione.

In questo Istituto essendo da tempo oggetto di studio il gruppo dei bacilli, ossia di quelle forme batteriacee allungate, capaci di far spore [bacilli nel senso di Lehmann e Neumann (1)], ed essendosi proceduto all'isolamento anche dei germi i quali si trovano nelle radici delle papilionacee, dal Condelli, tra i quali anche del *Bacillus radicicola,* servendosi dell' agar-agar precedentemente privato delle sostanze solubili, secondo la tecnica indicata dal Beyerinck; ho sottoposto il germe, corrispondente ai caratteri del *Bacillus radidicola*, ad uno studio morfologico, seguendo i metodi di diagnosi i quali sono indicati per lo studio dei batteri in genere, tanto più che

(1) *Batteriologia.* Società editrice libraria, Milano.

le descrizioni sinora date di tale microrganismo, non potevano ritenersi complete.

Riferisco in dettaglio i saratteri dei germi isolati.

Caratteri colturali in agar a piatto.

Lo sviluppo di questi germi è diverso a seconda che si adoperi l'agar comune o l'agar fatto col metodo di Beyerinck.

Nell'agar comune si ha lo sviluppo di colonie più grandi di una capocchia di spillo, trasparentissime, a bordi lobati, piane, salvo che nel centro ove si nota un punto più rilevato e più spesso, biancastro.

Nell'agar di Beyerinck, le colonie sono spesse, grandi, a bordi lobati, di colorito bianco-sporco, a superficie non liscia, ma come leggermente ondulata con nucleo centrale rilevato. Attorno alla colonia si nota costantemente un bordo chiaro trasparente che pare sia dato dalla chiarificazione del substrato colturale. Osservate a debole ingrandimento, queste colonie appaiono grossolanamente granulose, venate, e presso il bordo presentano un cerchio concentrico dal quale si spargono nell'alone chiaro descritto, una serie di filamenti a treccia di capelli, che ricordano lo sviluppo del bacillo del carbonchio.

Sull'agar solidificato a becco di flauto, si ha la formazione di una patina discontinua, costituita dalla giustapposizione di colonie sottili ceruleo a bordi lobati con nucleo centrale.

In gelatina per infissione, sviluppo in superficie poco rigoglioso, talvolta appena percettibile.

Lungo la linea di innesto, si ha o un nastrino più o meno esile, continuo, o discontinuo, e come formato dalla riunione di coloniette puntiformi. La gelatina non viene fluidificata.

Sulle patate si ha la formazione di una patina spessa, bianco-sporca, a superficie leggermente ondulata, piuttosto secca.

In brodo, si ha uno sviluppo uniforme nel substrato di nutrizione, il quale viene qualche volta intorbidato.

Caratteri microscopici.

A fresco. — Forme allungate a bastoncino, lunghe 3-4 micron, larghe da 0.7 a 0.9, disposte isolatamente o riunite insieme in modo da formare dei filamenti lunghi persino 10-12 micron, a contenuto apparentemente omogeneo.

Mediante colorazione semplice. — Colorando coi colori basici di anilina in soluzione idroalcoolica (bleu di metilene, fucsina, violetto di genziana) si nota che questi germi prendono malamente il colore, per cui appaiono pallidi, per cui anche i preparati recenti sembra che siano di una data molto antica. Notevole il fatto che attorno al germe sembra esistere uno straterello di materiale rifrangente ed involgente, il quale assume lo stesso co-

lore del batterio, ma in una gradazione di molto più sbiadita. Degli undici bacilli studiati, solo quattro non lo possedevano.

Colorando con i medesimi *colori mordenzati*. e specialmente col bleu di Loeffler, appaiono nel contenuto del germe dei granuli bipolari che assumono più intensamente la colorazione.

Trattando i medesimi germi col *metodo del Gram*, questi germi rimangono colorati col colore di contrasto, soltanto qualcuno sembra mostrare qualche punto che trattiene la colorazione violetta.

Preparati a goccia pendente. — Le gocce pendenti da brodo-colture dimostrano che questi germi sono dotati di un movimento proprio di translazione, serpentino, movimento di cui sono dotati, non solo le forme isolate, ma anche i filamenti. Perchè però tale fenomeno si possa con costanza notare, è necessario trarre il materiale da recenti brodo-colture, poichè se queste hanno una data superiore ad una settimana, è facile notare che alcune di essi si immobilizzano: da quello che ho potuto vedere, la immobilità dei germi è il segnacolo della formazione delle spore; e ciò avviene in circa un mese.

Sia nei substrati solidi che liquidi, questi germi sporificano formando spore ovalari rifrangenti e grandi, le quali traggono la loro origine da granuli che si notano quasi sempre nei poli del germe. Infatti colorando il germe in diverse epoche dal loro sviluppo col metodo indicato dal Fedorowitsch (1) per la diagnosi e riconoscimento delle spore, si nota che i granuli si ingrandiscono, assumono l'aspetto delle cosidette protospore, e si rendono liberi con la distruzione del corpo bacillare, sotto forma di tipiche spore.

***

Questi sono in genere i caratteri presentati dai germi isolati. Però sottomettendo ad uno studio particolareggiato le varie forme da me isolate, ho potuto notare dei caratteri diversi: nella struttura della colonia — nello sviluppo in agar solidificato a becco di flauto — su patate — in brodo — in gelatina — nella sporificazione; caratteri i quali tendono a differenziare questi germi.

Riferisco ora particolareggiatamente questi caratteri.

Struttura delle colonie.

Le colonie dei germi da me presi in esame, furono in numero di 11, e le distinguerò con i numeri 1, 2, 3... fino ad 11.

---

(1) Centr. f. Bakt. 1 Abt. 1902.

COLONIA 1.

Colonie di cinque giorni grandi quanto una capocchia di spillo, bianco-sporche zigrinate con alone periferico, areolate, molto simili a quelle del bacillo carbonchioso. All'ingrandimento di circa 60 diametri, restano costituite da un nucleo centrale più scuro da cui si dipartono delle venature raggiate, per modo da dare alla colonia un aspetto cespuglioso che si estende dall'interno della colonia all'alone periferico, il quale si presenta trasparentissimo ed ondulato in modo da ricordare la periferia della colonia del bacillo del tifo.

COLONIA 2.

Colonie bianco-sporche, piuttosto umide con la parte centrale un po' più rilevata, a bordi che paiono finamente areolati, fornite di un nucleo centrale visibile nella parte inferiore della colonia. A forte ingrandimento, si mostrano simili alla precedente, con la sola differenza che le venature sono meno appariscenti e non si originano dal centro della colonia, centro che è molto visibile ed appariscente.

COLONIA 3.

Colonie più grandi di una capocchia di spillo, rotonde a superficie piana di colorito bianco-giallastro, a bordi regolari, umide. All'ingrandimento di 10 diametri si mostrano costituite da un contenuto fortemente granuloso, entro il quale si nota la formazione di venature che si dipartono da un nucleo centrale visibile, ma non però perfettamente delineato. Questa parte granulosa, si sfiocca alla periferia in un alone più chiaro, molto piccolo, finissimamente granuloso.

COLONIA 4.

Macroscopicamente simili alle precedenti. All'ingrandimento di 60 diametri, queste colonie presentano un alone più limitato, ed il bordo esterno presenta emanazioni filiformi ondulate, distaccate le une dalle altre, raggomitolantesi variamente in modo da ricordare perfettamente la periferia della colonia del bacillo carbonchioso vista a forte ingrandimento di 110 a 120 diametri.

COLONIA 5.

Colonie molto più grandi di una capocchia di spillo, piane trasparenti, sottili irregolari, le quali si spandono nel substrato di nutrizione a gettoni cespugliosi che ricordano il modo di sviluppo dei batteri Zopfiani. All'ingrandimento di 60 diametri, si mostrano finamente granulose, di un colorito

giallo-sporco a bordi circonvoluti, finissimamente granulosi, largamente espansi nel substrato di nutrizione. La massa della colonia si presenta più scura pieghettata, e si ha l'impressione che la espansione della colonia si debba al distendimento ed alla espansione di tale pieghettatura.

COLONIA 6.

Colonie simili alla precedente, però presentano la diramazione a cespuglio da una parte centrale, spessa, bianco-sporca, rilevata nel centro, con un nucleo puntiforme visibile. All'ingrandimento di 60 diametri, presentano un contenuto venato attorno ad un punto centrale granuloso rotondeggiante, che male si delimita per lo spessore della colonia. Le venature radiate terminano alla' periferia della colonia, in un anello granuloso, ma più chiaro, dal quale si originano i bordi circonvoluti che si espandono nel substrato di nutrizione e che presentano i medesimi caratteri di quelli della colonia precedente.

COLONIA 7.

Colonie della grandezza di una capocchia di spillo, di colorito bianco-sporco, areolate, a superficie zig inata, molto simili a quelle del bacillo carbonchioso. All'ingrandimento di circa 60 diametri restano costituite da una zona più scura che occupa gran parte della colonia, la cui periferia si spande in un grande alone chiaro, finamente granuloso, a bordi regolari. La colonia ingrandita ricorda quella del bacillo sottile.

COLONIA 8.

Colonie più grandi di una capocchia di spillo, perfettamente rotonde, con nucleo centrale di colorito bianco-sporco, ed un alone periferico ceruleo molto grande, i cui bordi sono leggermente ondulati. All'ingrandimento di 60 diametri, si presentano costituite da un nucleo centrale sferico, perfettamente delimitato, finamente granuloso, il quale è circondato da un sottile alone periferico bianco trasparentissimo, che è perfettamente identico a quello delle altre colonie ricordate.

COLONIA 9.

Colonie rotondeggianti, quasi grandi quanto una capocchia di spillo, cerulee, trasparenti, a bordi regolarissimi, leggermente cupoliformi, che all'ingrandimento di circa 60 diametri, paiono finissimamente granulose, senza nucleo.

COLONIA 10.

Le colonie sono simili, nel loro contenuto, alle precedenti: però, i bordi sono sfrangiati, ramosi, tanto che nel complesso la colonia ha un aspetto solare. Dippiù il colorito delle colonie è giallo-sporco.

COLONIA 11.

Colonie più grandi di una capocchia di spillo, di colorito giallo-sporco, di forma irregolarmente sinuosa, a bordo più trasparente. All'ingrandimento di circa 60 diametri si presentano uniformemente granulose, opache, senza alcun carattere speciale nel loro contenuto, circondate da un sottile alone trasparente che segue le irregolari sinuosità dei bordi della colonia, e a sua volta presentasi col bordo esterno regolarissimo.

Dallo studio comparativo di tutte queste colonie, possono ridursi ai seguenti cinque tipi, che indico in lettere alfabetiche.

TIPO *A*.

Colonie dall'aspetto venato con nucleo centrale più o meno marcato, ed i cui bordi cespugliosi non oltrapassano l'alone chiaro pe-

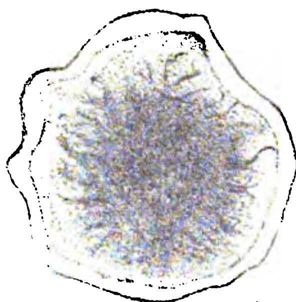


Fig. 1ª.

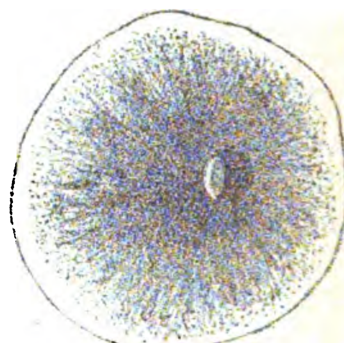


Fig. 2ª.

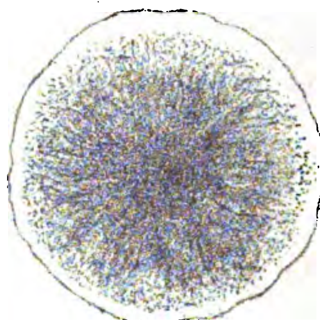


Fig. 3ª.

riferico che le delimita. Vi appartengono le colonie dei germi indicati coi numeri 1, 2, 3 (fig. 1ª, 2ª, 3ª).

TIPO *B*.

Colonie simili alle precedenti, ma i cui bordi cespugliosi si espandono più o meno largamente nel substrato di nutrizione. Vi

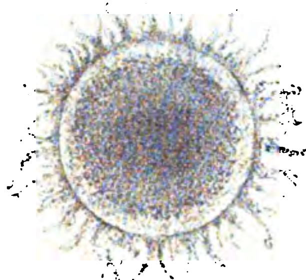


Fig. 4ª.

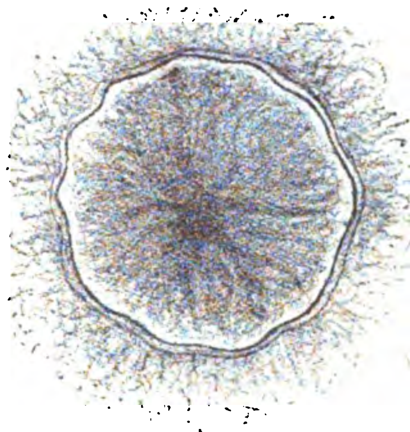


Fig. 5ª.

appartengono le colonie dei germi indicati coi numeri 4, 5, 6 (figure 4ª e 5ª).

TIPO *C*.

Colonie di struttura più o meno uniforme, circondate da un alone

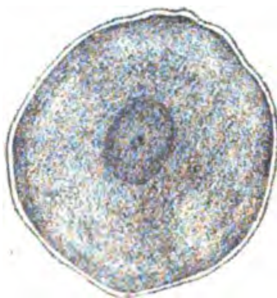


Fig. 6ª.

chiaro periferico che nettamente le delimita, e con nucleo. Vi appartengono le colonie dei germi indicati col numero 8 (fig. 6ª).

TIPO *D*.

Colonie simili alle precedenti, ma senza nucleo. Vi appartengono

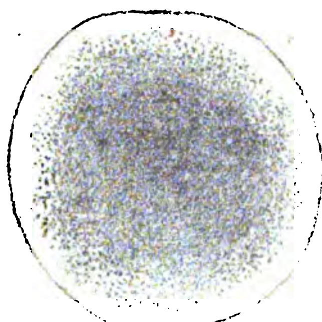
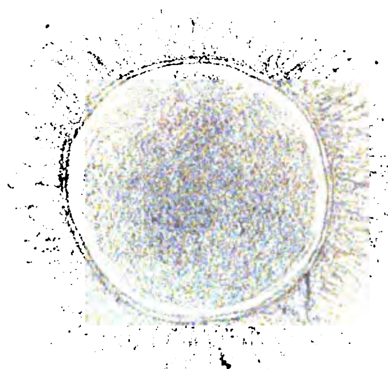

Fig. 7ª.


Fig. 8ª.

le colonie dei germi indicati coi numeri 7, 9, 10 (fig. 7ª e 8ª).

TIPO *E*.

Colonie di colorito giallo-sporco a sole. Vi appartengono le colonie


Fig. 9ª

dei germi indicati col numero 11 (fig. 9).

Colture per strisciamento su agar solidificato a becco di flauto.

(*Colture di 10 giorni*).

I bacilli n. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10 presentano sviluppo di una sottile patina trasparentissima, poco diffusa dalla linea di innesto, formante tutt'uno col substrato di nutrizione, a bordi regolari lobati, sulla quale patina emergono puntini più spessi, biancastri, trasparenti. Questa patina sembra risultare dalla fusione di una serie di colonie rotonde piuttosto grandi, ad alone trasparentissimo, ai bordi dei quali si notano queste rilevature, separate, puntiformi.

Si presenta tipicamente a colonie staccate *il bacillo n. 7*.

Il bacillo n. 3 presenta in superficie una fine zigrinatura che ricorda quella del bacillo carbonchioso.

Il bacillo n. 8 presenta uno sviluppo analogo ai precedenti, però la patina è uniformente liscia, acquosa, come se fosse passata sull'agar una striscia di acqua torbida. Su questa stria si notano rari puntini biancastri rilevati.

Il bacillo n. 11 e *il n. 9* danno sviluppo ad una patina sottile omogenea, trasparente, diffusa su tutto il substrato di nutrizione, continua, estremamente delicata, senza alcun carattere speciale.

Sviluppo su patate.

(*Colture di tre giorni*).

I bacilli n. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10 presentano uno sviluppo rigoglioso sotto forma di una patina, bianco-sporca, spessa, continua, omogenea, umida, grossolana, diffusa su tutta la superficie del terreno di nutrizione. L'aspetto della patina ricorda quello dei blastomiceti. La patata non assume colorazione alcuna.

Il bacillo n. 3 presenta uno sviluppo abbastanza rigoglioso sotto forma di una patina bianco-sporca, spessa, omogenea, secca, con tendenza ad aspetto finissimamente polveroso, che non tende a diffondersi molto sulla superficie del substrato di nutrizione.

L'aspetto della patina ricorda molto quello di un oidio. La patata non assume colorazione alcuna.

Il bacillo n. 11 presenta uno sviluppo rigoglioso, sotto forma di una patina bianco-giallastra-sporca, spessa, a superficie ondulata, di consistenza cremosa, quasi reticolata, abbastanza diffusa sul substrato di nutrizione.

La patata assume un colorito bruno.

I bacilli n. 8 e 9 presentano uno sviluppo impercettibile, non visibile ad occhio nudo.

Colture per infissione in gelatina.

(*Colture di otto giorni*).

I bacilli n. 3, 6, 8, 9 e 11 presentano uno sviluppo appena percettibile sulla superficie del cilindro di gelatina, sotto forma di una patina limitata al punto d'innesto, bianchiccia, a bordi irregolari, dai quali spesso emana un gittone arborescente. Lungo l'infissione si osserva un nastrino discontinuo, costituito dalla riunione di una serie di coloniette rotondeggianti del tipo di quelle dello streptococco: ciò a riguardo dei bacilli n. 6 e 3. Negli altri tre si ha la formazione di un nastrino sottilissimo senza caratteri speciali.

I bacilli n. 1, 2, 4, 5, 7 e 10 presentano sviluppo abbastanza rigoglioso in superficie, costituito da una patina piuttosto sottile, irregolare, diffusa ad aspetto tipicamente ed irregolarmente arborescente. Lungo l'infissione si ha un nastrino costituito dalla riunione di colonie puntiformi sul tipo di quelle dello streptococco.

Colture per infissione in agar di Beyerinck

In superficie sviluppo di una patina bianco-giallastra-sporca, abbastanza diffusa sul cilindro di gelatina, umida, con alone periferico separato dal nucleo della patina per mezzo di un cerchietto più chiaro: l'alone presentasi lobato con solcature strette e profonde. Nelle colture poi che hanno una data non recente, i lobi sono così avvicinati gli uni agli altri da dare al contorno della patina un aspetto areolato.

Lungo l'infissione, sviluppo nella linea d'innesto di un nastrino da cui emanano in senso trasversale delle gittate irregolari piane, parallele alla superficie del cilindro di gelatina, delle quali alcune raggiungono quasi le pareti del tubo, mentre altre ne rimangono separate; e precisamente le prime si trovano nella parte alta dell'infissione, le seconde invece si trovano nella parte bassa.

I bacilli n. 8 e 11 presentano sviluppo in superficie di una patina succosa, bianco-sporca, diffusa su tutto il cilindro di gelatina, umida, a superficie regolare. Lungo la linea di innesto, si ha sviluppo di un nastrino omogeneo, sottile, senza caratteri speciali.

Colture in brodo.

(*Colture di sette giorni*).

I bacilli n. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e *8* non intorbidano il brodo: formano un discreto deposito polveroso che si solleva a fiocchi.

Il bacillo n. 11 rende il brodo uniformemente torbido, con deposito granuloso

al fondo, velo biancastro in superficie alquanto irregolare, facilmente frammentabile. Scuotendo il tubo, dal velo cadono in basso dei fiocchetti grumosi.

Il bacillo n. 10 non intorbida il brodo, forma un deposito quasi nullo al fondo; in superficie velo spesso, accartocciato, bianco sporco, rimontante le pareti del tubo di pochi millimetri, simile ad un velo di mesenterico.

I bacilli n. 9 e *5* non intorbidano il brodo; formano un deposito finissimamente polveroso, scarso al fondo; sviluppo in superficie impercettibile. Smuovendo il tubo, dalla superficie si vedono scendere verso il fondo, finissime nubecole.

Confrontando tutti i caratteri che si raccolgono dallo sviluppo in agar, su patate e in brodo, a me pare che si possano mantenere i *cinque* tipi, in cui, per mezzo dei caratteri delle colonie, ho distinto gli 11 germi studiati. Ognuno di questi tipi possederebbe le seguenti note caratteristiche.

Tipo *A*.

Vi appartengono i bacilli ai numeri 1, 2, 3.

Caratteri microscopici.

Bacilli lunghi circa 4 micron con estremi arrotondati, riuniti ad ammassi aventi un granulo a ciascun polo: attorno al germe sembra esistere uno straterello di materiale rifrangente ed involgente, che assume, in gradazione più sbiadita, lo stesso colore del bacillo. Si colorano meglio coll'Ehrlich che con lo Ziehl. Non resistono al Gram. Si dispongono riuniti tra loro, talora irregolarmente ad ammassi, talora parallelamente a fascetti. Sono mobilissimi.

Caratteri colturali.

In agar a piatto. — Colonie grandi quanto una testa di spillo, dall'aspetto venato con nucleo centrale, ed i cui bordi cespugliosi non oltrepassano l'alone chiaro periferico che le delimita.

Su agar a becco di flauto. — Patina sottile trasparentissima, poco diffusa dalla linea di innesto, a bordi regolari, sulla quale emergono puntini biancastri trasparenti: essa presenta alle volte come una fine zigrinatura.

Su patate. — Patina bianco-sporca, spessa, continua, omogenea, con tendenza ad un aspetto polveroso, la quale non tende a diffondersi molto sulla superficie del substrato di nutrizione.

In gelatina per infissione. — In superficie, patina più o meno diffusa, bianchiccia, ad aspetto arborescente. Lungo l'infissione, nastrino costituito dalla riunione di colonie puntiformi.

In agar di Beyerinck per infissione. — In superficie, patina bianco-giallastro-sporca. Lungo l'infissione, nastrino da cui emanano in senso trasversale delle gittate parallele alla superficie del cilindro di gelatina.

In brodo. — Brodo non intorbidato, discreto deposito polveroso che si solleva a fiocchi.

TIPO *B*.

Vi appartengono i bacilli contrassegnati coi numeri 4, 5, 6.

Caratteri microscopici.

Bacilli identici a quelli del tipo precedente con scarsa sostanza cementante.

Caratteri colturali.

In agar a piatto. — Colonie molto più grandi di una testa di spillo, ed i cui bordi cespugliosi, oltrepassando l'alone periferico che le delimita, si espandono più o meno largamente nel substrato di nutrizione.

Su agar a becco di flauto. — Patina sottile trasparentissima, poco diffusa dalla linea di innesto, a bordi regolari, sulla quale emergono puntini biancastri trasparenti.

Su patate. — Patina bianco-sporca, spessa, continua, omogenea, umida, grossolana, diffusa su tutta la superficie del terreno di nutrizione.

In gelatina per infissione. — In superficie sviluppo abbastanza rigoglioso, con patina sottile irregolare diffusa, ad aspetto tipicamente arborescente. Lungo l'infissione, nastrino costituito dalla riunione di colonie puntiformi.

In agar di Beyerinck per infissione. — Sviluppo del tutto simile al tipo *A*.

In brodo. — Brodo non intorbidato, discreto deposito polveroso al fondo.

Tipo *C.*

Vi appartengono i bacilli contrassegnati col numero 8.

Caratteri microscopici.

Bacilli molto corti e tozzi, come cementati da sostanza agglutinante, essi formano delle vere zooglee. Poco evidenti i granuli polari, discreta mobilità, non resistono al Gram.

Caratteri colturali.

In agar a piatto. — Colonie poco più grandi di una capocchia di spillo, perfettamente rotonde, con nucleo centrale sferico perfettamente delimitato, e sottile alone periferico bianco, trasparentissimo.

Su agar a becco di flauto. — Patina sottile uniformemente liscia, acquosa, di aspetto torbido, su cui si notano rari puntini biancastri rilevati.

Su patate. — Sviluppo impercettibile, non visibile ad occhio nudo.

In gelatina per infissione. — In superficie, sviluppo appena percettibile di una patina bianchiccia a bordi irregolari. Nastrino sottilissimo lungo la linea d'infissione.

In agar di Beyerinck per infissione. — Sviluppo in superficie di una patina succosa, bianco-sporca, diffusa, umida, a superficie regolare. Lungo la linea di infissione, sviluppo di un nastrino omogeneo, sottile.

In brodo. — Brodo non intorbidato, con discreto deposito polveroso che si solleva in fiocchi.

Tipo *D.*

Vi appartengono i bacilli contrassegnati coi numeri *7*, *9*, *10*.

Caratteri microscopici.

Bacilli molto lunghi con granuli polari evidentissimi; senza essere cementati da sostanza agglutinante, si dispongono a catene di 2, 3, 4, anzi in veri filamenti di diversi elementi. In generale

si colorano meglio collo Ziehl. Qualche forma sembra in certo modo resistere al Gram.

Sono mobilissimi, dotati di movimento proprio di traslazione serpentino, movimento di cui sono dotati anche i filamenti.

Caratteri colturali.

In agar a piatto. — Colonie della grandezza di una capocchia di spillo, rotondeggianti, a bordi regolarissimi, leggermente cupoliformi, di colorito bianco-ceruleo, che all'ingrandimento di circa 60 diametri, paiono finissimamente granulose, senza nucleo e con alone chiaro periferico.

Su agar a becco di flauto. — Sviluppo di una patina sottile trasparente, poco diffusa dalla linea di innesto, a bordi regolari lobati.

Su patate. — Sviluppo rigoglioso di una patina bianco-sporca, spessa, continua, omogenea, diffusa.

In gelatina per infissione. — In superficie, sviluppo abbastanza rigoglioso di una patina piuttosto sottile, irregolare, diffusa, ad aspetto tipicamente arborescente. Lungo l'infissione, nastrino sottilissimo, costituito dalla riunione di colonie puntiformi.

In agar di Beyerinck per infissione. — Sviluppo del tutto simile ai tipi *A* e *B*.

In brodo. — Brodo non intorbidato, deposito polveroso al fondo.

TIPO *E*.

Vi appartengono i bacilli contrassegnati col numero *11*.

Caratteri microscopici.

Bacilli piuttosto lunghi, con estremi arrotondati, con granuli bipolari evidentissimi, mobilità normale, non resistono al Gram, sporificano prestissimo.

Caratteri colturali.

In agar a piatto. — Colonie più grandi di una capocchia di spillo, di colorito giallo sporco, di forma irregolarmente sinuosa, a bordo trasparente a raggiera.

In agar a becco di flauto. — Patina sottile omogenea. trasparente, diffusa, continua, estremamente delicata.

Su patate. — Sviluppo rigoglioso di una patina bianco-giallastro sporca, spessa, abbastanza ondulata e diffusa sul substrato di nutrizione. La patata assume un colorito bruno.

In gelatina per infissione. — In superficie, sviluppo appena percettibile. Lungo la linea di innesto, formazione di un nastrino sottilissimo.

In agar di Beyerinck per infissione. — Sviluppo in superficie di una patina succosa, bianco-sporco, umida, regolare, diffusa. Lungo la linea d'innesto, sviluppo di un nastrino omogeneo sottile.

In brodo. — Brodo uniformemente e fortemente torbido, deposito granuloso al fondo, velo biancastro in superficie, alquanto irregolare, facilmente frammentabile. Scuotendo il tubo, dal velo cadono in basso dei fiocchetti.

***

Come si vede dai caratteri fin qui esposti, un' unica descrizione come è stata data da altri del *Bacillus radicicola* non è possibile: si deve quindi ammettere che il *Bacillus radicicola* non sia una individualità batterica ben distinta, ma che rappresenti un gruppo di germi, aventi in comune soltanto caratteri generali.

Istituto d'Igiene di Lima (Perù)

Un metodo nuovo per coltivare estemporaneamente gli anaerobi obbligati

per il Dott. U. BIFFI

Medico Igienista del Municipio di Lima.

Fra i molti metodi proposti per la coltura degli anaerobi, scarsi sono quelli che riuniscono la praticità nella esecuzione al rigore scientifico. È questa la ragione perchè nei laboratori clinici si è lavorato e si lavora pochissimo sopra gli anaerobi. Chi non è batteriologo di professione considera quasi sempre il fare una coltura fuori del contatto dell'aria come un còmpito troppo difficile, come un lavoro lungo e sgradevole. Va perduto così un materiale patologico qualche volta veramente prezioso.

Infatti non dobbiamo dimenticare che la maggior parte del nostro organismo si presta mirabilmente allo sviluppo dei batteri anaerobi, perchè se è vero che il sangue porta ossigeno a tutti i tessuti, è altresì vero che le cellule di questi lo assorbono avidamente.

Ciò che succede nell'organismo vivo può essere paragonato a quanto si verifica allorchè si coltiva un germe anaerobico mescolato ad uno spiccatamente aerobio in presenza dell'aria: il primo può svilupparsi perchè l'ossigeno dell'aria viene assorbito dal secondo. Nella stessa guisa possono svilupparsi gli anaerobi in una specie di simbiosi colle cellule dei nostri tessuti perchè l'ossigeno portato dal sangue viene assorbito da queste.

È desiderabile quindi che nelle cliniche e, in generale, negli ospedali si moltiplichino le investigazioni in questo senso. I lavori di Achalme, di Veillon e di molti altri autori ci fanno fede che simili ricerche possono condurre a brillanti risultati.

Però, come dicevo, perchè il clinico non indietreggi davanti a questo genere di lavori, è indispensabile offrirgli metodi semplici e sicuri, che non gli facciano perdere troppo tempo e gli diano garanzia di buoni risultati.

I metodi che oggigiorno si impiegano di più sono quello di Liborius (*Kultur in hoher Schicht*) originale e nelle sue numerose modificazioni, e quelli fondati sulla protezione del terreno culturale per mezzo di olio di olivo o di sostanze analoghe come la lanolina (Blumenthal) o l'olio di vaselina (Nicolle). Però con questi metodi la esclusione dell'ossigeno non può essere assoluta come risulta anche dal recente lavoro del Rivas; e d'altra parte le esperienze di Matzuchita ci dimostrano col potere di persuasione dei numeri la estrema sensibilità degli anaerobi obbligati anche a piccole quantità di ossigeno. Per ciò che riguarda poi il secondo dei metodi citati, conviene notare anche il grave inconveniente di dover attraversare coll'ansa di platino o colla pipetta lo strato grasso tanto nel seminare quanto negli eventuali trapianti, e l'altro più grave ancora che vari germi emulsionano il grasso intorbidando così il mezzo di coltura.

Il procedimento che io propongo è molto semplice e dà ottimi risultati, cosa di cui ho potuto convincermi ripetutamente. Ho cercato nei migliori e più completi trattati di batteriologia pubblicati in questi ultimi anni e in vari dei più importanti e diffusi periodici tecnici senza trovare accennato nulla di simile. Per cui, fino a prova contraria, lo ritengo nuovo o, per lo meno, inedito.

Si prende una provetta delle più lunghe che si trovino in commercio e si pratica una strozzatura nella sua parte superiore a 2-3 cm. circa dalla bocca (fig. 1). Si riempiono di brodo due terzi del tratto inferiore, si chiude superiormente con un tappo di cotone e si sterilizza all'autoclave.

Quando si vuol praticare la coltura di un anaerobio, si fa bollire dapprima il brodo per qualche minuto per espellere l'aria in soluzione; poi si raffredda il tubo rapidamente e con una pipetta a punta molto lunga o con un lungo ago di platino si porta il materiale di semina *fino al fondo della provetta.* Subito dopo si rammollisce alla fiamma di un becco Bunsen o di una comune lampada ad alcool, il vetro della provetta in corrispondenza della parte superiore della sua strozzatura e si converte così questa parte in un tubetto lungo e sottile, che verrà rotto poi in un punto in cui presenti presso a poco mezzo millimetro di diametro interno. Risulterà così un tubo come quello rappresentato dalla fig. 2.

Si afferra allora con una pinza o semplicemente colla mano il tubo per il suo fondo e tenendolo inclinato si riscalda sopra una piccola fiamma l'estremo superiore della colonna liquida (fig. 7). Questa parte del mezzo culturale entrerà presto in ebollizione e comincerà ad uscire vapore dal tubetto terminale. È necessario tenere in leggero ma continuo movimento per mezzo di piccole scosse, la superficie superiore del liquido perchè la fiamma non riscaldi soverchiamente il vetro asciutto, il quale arrivando poi in contatto col liquido, inevitabilmente si fenderebbe. Del resto il procedimento è analogo a quello che generalmente si adotta quando si vuol vedere se una orina contiene albume: in questo caso si acidifica l'orina contenuta in un tubo d'assaggio e si porta in seguito sulla fiamma la parte superiore della colonna liquida per confrontarla poi colla inferiore che è rimasta fredda.

Quando si vede che il vapore esce con forza, si allontanerà momentaneamente la provetta dalla fiamma per riportarvela subito dopo allorchè il getto di vapore sia diminuito. Dopo 1-2 minuti tutta l'aria contenuta nel tratto superiore vuoto del tubo è rimpiazzata da vapore acqueo. Allora, approfittando di un momento in cui il vapore esce con forza, si porta la punta del tubetto terminale nella parte più calda della fiamma. Per alcuni istanti continua a uscir vapore, che sposta la fiamma come lo farebbe un cannello ferruminatorio; frattanto il vetro si è fuso e nel momento in cui la pressione interna è uguale o poco superiore all'esterna, vale a dire prima che possa penetrare aria, il tubetto spontaneamente si chiude.

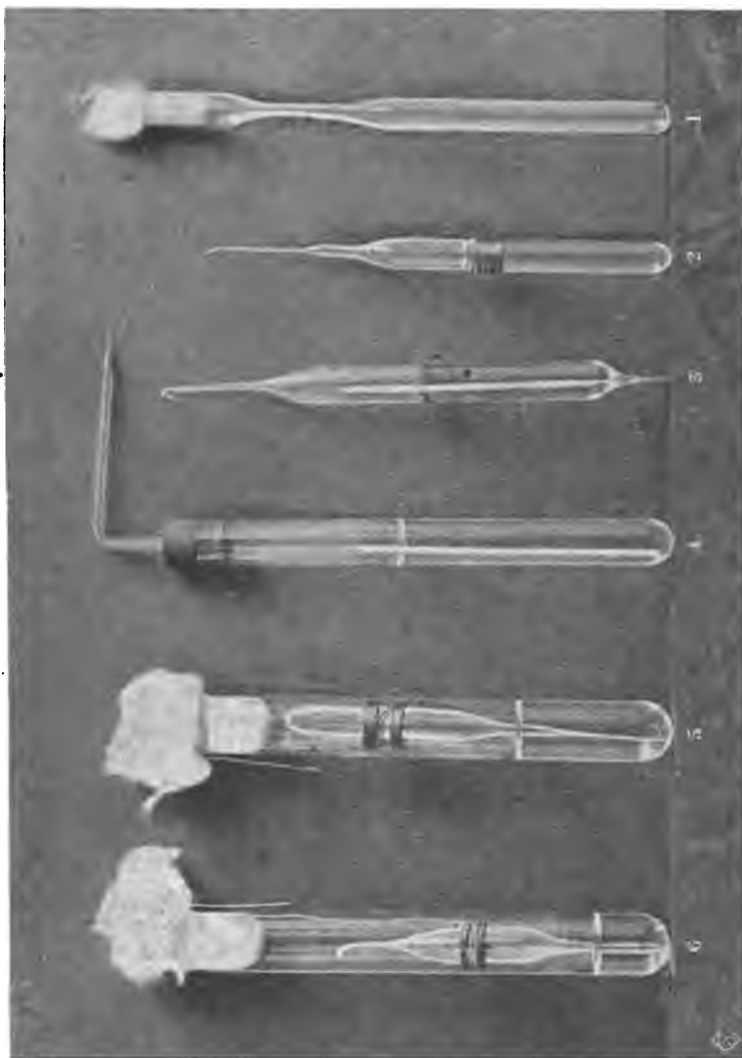
Si porta la provetta immediatamente sotto un getto di acqua fredda; *si comincerà dal raffreddare la colonna liquida e solo in seguito si lascerà cadere l'acqua fredda sulla parte superiore vuota del tubo:* ciò allo scopo di evitare che il brodo entri in tumultuosa ebollizione.

Il filo metallico (di rame o di ferro dolce) avvolto a spirale, che si nota nelle figure 2ª e 7ª serve per affrettare l'ebollizione della parte superiore del liquido; però, come ben si comprende, non è assolutamente necessario.

Invece di brodo, si può impiegare agar, gelatina, latte o qualsiasi altro mezzo culturale che non venga modificato dall'ebollizione. Per colmo di prudenza, se si teme che tracce minime di aria possano rimanere in soluzione nel liquido, si potranno aggiungere ai terreni di cultura piccole quantità di sostanze atte ad assorbire l'ossigeno come, ad esempio, il formiato o il solfoindigolato di soda.

Come si vede, il metodo è basato su tre principî:

1° La eliminazione completa dell'aria per mezzo della ebollizione, della cui efficacia ci fanno fede i numerosi metodi di analisi chimica quantitativa dei gas che si fondano su di essa, fra i quali



basterà citare la determinazione dei nitrati nelle acque secondo Schulze e Tiemann e quella dei gas disciolti nell'acqua potabile col metodo di Zune;

2° La cattiva conduttività dell'acqua per il calore, ciò che per-

mette di far bollire la parte superiore del mezzo culturale contenuto nel tubo d'assaggio senza che la temperatura dell'estremo inferiore si innalzi sensibilmente;



3° La diminuzione della densità di un liquido per il riscaldamento, ciò che impedisce, nel caso nostro, che la parte superiore riscaldata e quindi più leggera discenda a mescolarsi colla inferiore più fredda e quindi più densa della colonna liquida.

***

La fig. 4 rappresenta una modificazione destinata a raccogliere e analizzare i gas che si sviluppano nella maggior parte delle culture anaerobiche.

Si tratta di una robusta provetta lunga circa 20 cm. e del diametro di 15-20 mm., chiusa ermeticamente con un tappo di gomma attraversato da uno dei bracci di un tubetto di vetro piegato ad angolo retto; l'altro braccio termina in una punta affilata. Si riempie la provetta per due terzi con terreno di coltura. È facile comprendere come, seguendo il metodo descritto sopra, si possa seminare il mezzo di cultura e vuotare d'aria il tubo. Solo alcuni dettagli meritano ulteriore spiegazione.

Il tubo di vetro che attraversa il tappo deve arrivare fino all'estremità inferiore di questo senza sorpassarla; altrimenti si formerà nella parte superiore della provetta un deposito di aria che difficilmente potrà essere completamente eliminato.

Il piccolo tubo di vetro che si nota nella parte interna, immerso parzialmente nel liquido culturale (fig. 3 e 4) serve come indicatore della pressione che esiste nell'interno della provetta. Lo descriverò brevemente:

Si prende un tubicino di vetro di circa 3 mm. di diametro e a pareti sottili come si può facilmente ottenerlo scaldando alla lampada un tubo d'assaggio ordinario, stirandolo e tagliando la parte sottile che così risulta. La lunghezza del tubetto deve essere di 2-3 cm. superiore all'altezza della colonna liquida del mezzo culturale; lo si chiude alla lampada ad una estremità e lo si riempie per l'altra di brodo.

Fatto ciò, lo si introduce nel liquido colturale della provetta, col suo estremo aperto rivolto in basso. Fino a tanto che l'apparecchio si trova in comunicazione libera coll'aria esterna il tubetto rimane pieno per effetto della pressione atmosferica; però quando per mezzo dell'ebollizione si sarà fatto il vuoto, si vedrà discendere il liquido nel tubetto fino a porsi all'altezza del brodo contenuto nel tubo grande. Piccole differenze di livello fra le due superfici liquide devono attribuirsi a fenomeni di capillarità.

Se, per sviluppo di gas, aumenta la pressione nell'interno della provetta, contemporaneamente si innalza nel tubetto indicatore il livello della colonna liquida; quando questo sarà pieno vorrà dire che la pressione interna è uguale o superiore all'esterna. Allora si porrà in comunicazione mediante un tubo di gomma pieno di acqua

o del liquido che più convenga nel caso speciale, attenendosi a tutte le altre norme che si seguono nell'analisi dei gas, la provetta col recipiente in cui i gas dovranno essere raccolti. Si stabilirà la comunicazione rompendo la punta sottile del tubo di vetro piegato ad angolo retto dentro al tubo di gomma che lo connette alla campanella in cui si raccolgono le sostanze gassose.

Per non perdere quella parte dei gas che rimane stagnante nella porzione della provetta si darà a questa nella sua parte bassa la forma indicata dalla fig. 3, allo scopo di poter espellere tutti i gas mediante introduzione di liquido per l'estremità inferiore.

***

Nelle figure 5 e 6 è rappresentata un'altra modificazione del metodo, molto comoda in casi speciali.

In provette grandi e a pareti robuste si introducono 10-15 cm. di brodo e quindi un tubo simile a quello della fig. 2 nel quale si sarà fatto anteriormente il vuoto per ebollizione di una piccola quantità di acqua. Questo secondo tubo dovrà essere immerso colla sua parte sottile nel brodo fino a toccare il fondo della provetta. Per mezzo di un filo di rame sarà sospeso nello stesso tempo all'orlo superiore di questa; il filo passerà naturalmente fra la parete di vetro e il tappo di cotone.

I due anelli di gomma che si notano nelle figure (si ottengono ritagliandoli da un tubo di gomma a pareti grosse) servono per impedire che il filo di rame scivoli sulla superficie levigata del vetro e allo stesso tempo per evitare che il tubo di vetro interno urti, in movimenti bruschi, contro all'esterno.

Preparate così le provette, si sterilizzano all'autoclave. Quando si vuol praticare una coltura anaerobica si fa bollire il mezzo di cultura per qualche minuto, lo si raffredda poi rapidamente e lo si semina. Fatto ciò si preme leggermente la punta sottile del tubo interno contro il fondo della provetta grande; la punta si rompe e il brodo contaminato si precipita nel tubo interno e lo riempie. In questo otterremo una coltura anaerobica, nel brodo che è rimasto nella provetta grande una coltura aerobica.

Trattandosi di anaerobi obbligati è però prudente coprire la superficie del mezzo culturale nella provetta grande con uno strato di olio o di lanolina.

Se si vuol conservare la coltura anaerobica si estrae per mezzo del filo di rame il tubo interno e lo si chiude alla lampada; quando

sia necessario praticar trapianti si rompe la punta, anteriormente lavata con alcool, servendosi di pinze sterilizzate; per l'apertura si penetra coll'ago di platino.

Invece di brodo possono usarsi, come ben si comprende, gelatina, agar, latte, ecc.

Il metodo può servire anche per separare un germe anaerobico da altri strettamente aerobi. In questo caso si fa penetrare brodo sterile dentro alla provetta interna e in seguito, si semina il miscuglio dei batteri nel brodo dell'esterna. In questo si svilupperanno i soli aerobi; nel tubo interno invece si svilupperà l'anaerobio. Ottenuto lo sviluppo, si estrae la provetta interna e si passa la sua punta alla fiamma per distruggere i germi aerobi rimasti aderenti a questa parte del tubo e per saldarla. Il dispositivo della fig. 6 permette di estrarre materiale per trapianti dalla parte superiore del tubo interno, ciò che può essere desiderabile come, per esempio, nel caso in cui siano presenti due anaerobi, uno immobile e l'altro mobile; allora il primo si sviluppa solo nella parte inferiore del tubo interno e dalla parte superiore si può estrarre il secondo in coltura pura. Usando mezzi culturali solidi la separazione è anche più facile, come ben si comprende.

Il metodo di coltura aerobico-anaerobica descritto sopra si presta assai bene anche per praticare la prova proposta da Drossbach e raccomandata da Di Vestea e Sclavo nell'analisi batteriologica delle acque potabili.

Da ultimo voglio notare un altro vantaggio del procedimento: quando si sviluppa gas come succede frequentemenle nelle culture anaerobiche, questo sposta una parte del liquido del tubo interno e lo fa passare nella provetta esterna, cosicchè la moltiplicazione dei germi non sarà mai ostacolata da un aumento di pressione nel tubo di cultura, ciò che non di rado si verifica colla maggior parte degli altri metodi.

Dippiù, siccome il gas eventualmente sviluppatosi si raccoglie nella parte alta della provetta interna, riesce facile e sicura l'osservazione dell'importante fenomeno biologico della produzione di sostanze gassose.

Tutte le manipolazioni necessarie per costruirsi da sè i piccoli apparecchi descritti son semplicissime. Dettagli in proposito possono trovarsi nel trattato di tecnica batteriologica dell'Abba o nel manuale di Eberth sulla lavorazione del vetro.

Lima, 10 maggio 1903.

BIBLIOGRAFIA.

1. Abba F. *Manuale tecnico di microscopia e batteriologia applicata all'igiene.* — Torino, 1902.
2. Achalme. Ann. Inst. Past. XI, 1897, pag. 845.
3. Blumenthal. *Culture extemporanée des microbes anaérobies en milieux liquides.* Presse méd., 1902, n. 85, p. 1016.
4. Di Vestea e Sclavo. Vedasi Abba, loc. cit., pag. 469.
5. Drossbach G. P. *Methode der bakteriologischen Wasseruntersuchung.* Chemiker Zeitung, 1893, p. 1483.
6. Eberth H. *Anleitung zum Gasblasen.* — Leipzig, 1895.
7. Ghon A. und Sachs N. *Ueber die anäerobe Züchtung.* Centrbl. f. Bakt. Erste Abt. Bd. XXXII, p. 403.
8. Matzuschita. Archiv. f. Hygiene, B. 43, H. 3-4.
9. Nicolle M. C. *Procédé de culture des microbes anaérobies.* Presse méd., 1902, n. 94, p. 424.
10. Rivas D. *Ein Beitrag zur Anaerobenzüchtung.* Centrbl. f. Bakt., Erste Abt. Bd. XXXII, p. 831.
11. Veillon et Zuber. *Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies.* Arch. méd. expér., Juillet, 1898.
12. Zune. *Traité d'analise des eaux potables.* — Paris, 1900.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

Contributo allo studio dell'alimentazione del contadino italiano.

L'alimentazione del pecoraro

pel dott. **FILIPPO CUTURI.**

Mi sono prefisso di studiare il tipo di alimentazione con latte di pecora e pane, in un primo periodo, e con ricotta di pecora e pane in un secondo periodo, perchè tale è il nutrimento abituale dei pastori, che in gran numero esistono nelle diverse regioni d'Italia.

Prima di cominciare tale studio, volli interrogare diversi pastori della campagna romana sul loro nutrimento abituale. Tutti furono concordi nel dirmi che, su per giù, la loro razione giornaliera si componeva di mezzo litro di latte di pecora, di grammi 300 di ricotta di pecora e di pane bianco, quanto bastava a soddisfare il loro appetito. Avendoli interrogati insistentemente se quest'alimentazione provocasse loro qualche disturbo o debolezza, risposero che stavano sempre bene e che avevano di molto a lodarsi di questo regime in confronto di quello degli altri contadini, che si nutrono di polenta, granturco ed erbe.

Le analisi fatte da Chevalier, Henry, Doieyre ed altri sul latte di pecora hanno dato questi risultati:

Nome degli analizzatori	Densità	Residuo secco °/₀	Caseina °/₀	Grasso °/₀	Lattosio °/₀	Ceneri °/₀
Chevalier e Henry	..	14.38	4.5	4.2	5.0	0.68
Doieyre.	..	18.4	4.0	7.5	4.3	0.9
Filcol e Ioby	1.035	18.82	7.0	7.2	4.0	0.62
Fleischamm	..	17.00	6.3	5.3	4.6	0.80
Boucardot Stomman. . . .	..	17.7	6.6	5.5	4.8	0.80
Marchand.	..	17.04	6.1	5.86	5.17	1.04

Il latte di pecora, dunque, è diverso dal latte di vacca; è più ricco di grasso e di caseina e forse diverso è anche il rapporto ponderale dei gliceridi che formano le materie grasse.

Per vedere se cotesta alimentazione sia veramente sufficiente, ho intrapreso i miei studi sul ricambio materiale di un giovane, nutrito con latte di pecora e pane in un primo periodo, e con ricotta di pecora e pane in un secondo.

Anastasio Corroni, è un giovane robusto, dell'età di 26 anni, celibe, cameriere, ben sviluppato nella persona, alto metri 1.59 e del peso di chilogrammi 63.800.

Indagando sull'anamnesi remota, ho trovato che all'età di 13 anni ebbe fabbre tifoide, ed a 16 anni soffrì di malaria, e le febbri durarono per 12 mesi circa. Niente sull'anamnesi prossima.

Ho voluto far queste indagini, affinchè nell'epoca, in cui si è assoggettato all'esperimento, non presentasse alcuna affezione, che avrebbe potuto portare una causa di errore all'esperimento stesso. Egli, seguendo il suo sistema abituale, faceva tre pasti al giorno: uno alle ore 8, uno alle ore 12, ed uno alle ore 18. La quantità dell'alimento era segnata dal suo senso di sazietà: beveva acqua.

Dormiva nell'Istituto d'Igiene, dove era sorvegliato da me e da un inserviente di fiducia.

Ogni mattina si pesava alla medesima ora e nelle stesse condizioni dei giorni precedenti. Conservava le feci e le urine delle 24 ore. Durante il regime misto, latte di pecora e pane, l'atto della defecazione si compiva nelle ore pomeridiane e alla sera, mentre prima di assoggettarsi a tale regime si compiva la mattina soltanto.

Per le analisi procedevo in questo modo: pesavo il pasto e di esso prendevo la ventesima parte per le analisi, conservandola in vaso a tappo smerigliato. Quando avevo riunito la parte aliquota dei tre pasti mescolavo tutto in un mortaro di porcellana, fino ad avere una poltiglia omogenea. Anche delle feci, prima ben bene rimescolate e pesate, prendevo la ventesima parte e delle urine solo 5 cmc., dopo averle misurate accuratamente.

Per determinare l'umidità, mettevo ad essiccare il pasto e le feci in crogiuolo di platino pesato, nella stufa a 100° C. fino a peso costante.

Per determinare l'azoto ho usato il metodo di Kyeldhal. In un pallone, cioè, di Iena, a collo lungo, della capacità di circa 800 cmc., mettevo 1 o 2 grammi di sostanza insieme a 10 cmc. di acido solforico, 25 cgm. di solfato di rame e 25 di ossido rosso di mercurio. Riscaldavo il pallone con fiamma diretta fino a che il liquido non fosse scolorato.

Lasciato raffreddare, diluivo il residuo in 200 cmc. di acqua, vi aggiungevo soda caustica fino ad alcalizzazione decisa e qualche goccia di solfuro di potassio, procurando sempre di mantenere raffreddato il pallone per non aver perdita di ammoniaca. Distillavo fino a che non si presentava più reazione alcalina e raccoglievo il distillato in un matraccio contenente 10 cmc. di soluzione $\frac{N}{2}$ di acido solforico. Titolavo aggiungendo una soluzione $\frac{N}{2}$ di

potassa servendo da indicatore la fenoltaleina. Dalla quantità di acido neutralizzato dall'ammoniaca distillata calcolavo l'azoto colla formola seguente:

$$N. \frac{7.5 \times R}{1000}$$

in cui R indica il numero di cmc d'acido consumato.

Le sostanze azotate si calcolavano moltiplicando l'azoto per 6.25.

Lo stesso processo adoperavo per determinare l'azoto delle urine.

Il grasso lo estraevo nell'apparecchio di Soxhlet. In un mortaio di porcellana mescolavo con sabbia due o tre grammi di pasto o di feci e mettevo ad essiccare la mescolanza nella stufa; trituravo e con cura chiudevo la polvere in un pacchetto di carta da filtro sgrassata. Il pacchetto si metteva in un estrattore di Soxhlet ove si lasciava in contatto con etere per 12 ore. Poi si distillava l'etere, il matraccio si faceva essiccare in stufa ad acqua bollente, si faceva raffreddare e si pesava.

Per la determinazione delle sostanze minerali, bruciavo, a blando calore, fino a sparizione completa del carbone, il pasto e le feci che avevano servito per la determinazione dell'umidità.

Le sostanze idrocarbonate le ho calcolate per differenza. Bisogna osservare che l'etere oltre al grasso estrae dalle feci l'indolo, lo scatolo, ecc.; quindi i grassi ottenuti dalle feci non sono solo grassi, ma una mescolanza in cui predominano i grassi; si potrebbe, cioè, meglio chiamare grasso grezzo.

Primo periodo di esperimento.

(*Alimentazione con latte di pecora e di pane*).

Il giorno 30 dicembre 1901 incominciai gli esperimenti. Il regime misto, di pane e latte di pecora, è durato 6 giorni: nei primi 3 non raccolsi nè feci nè urine, per essere sicuro che tutto il materiale estraneo a tale alimentazione fosse eliminato.

Avrei voluto prolungare per più giorni questa alimentazione; però non mi fu possibile per la mancanza di latte di pecora, avvenuta bruscamente per uno sciopero di garzoni lattai.

Ecco le cifre ottenute:

Media giornaliera del ricambio.

	Razione gr. 1859.33	Feci gr. 282.33	Urina cmc. 3806,6	Assorbimento 84.81 %.	Assimilazione	Perdite 15.18 %.
	Grammi					
Umidità	1345.171	712.623	..	..	..	..
Azoto	24.774	9.853	14.317	62 00 %	42.22 %	39.77 %
Sostanze azotate .	154.837	61.583	89.483	62.00 %	42.22 %	39.77 %
Grassi	124.443	7.737	..	93.78 %	..	6.29 %
Sostanze idrocarbonate.	215.002	50.254	..	76.62 %	..	23.37 %
Ceneri	15.105	9.176	..	45.87 %	..	60.74 %

Con cotesta alimentazione ho trovato che la perdita totale giornaliera fu in media di g. 15.18 %, la perdita delle sostanze azotate di grammi 39.77, mentre Voit, per il suo operaio medio normale ha trovato 12 %: la perdita del grasso di 6.29 %.

L'assorbimento delle sostanze azotate è stato di grammi 60.22 %.

L'assorbimento dei grassi fu di grammi 93.78 %, e l'assorbimento delle sostanze idrocarbonate di grammi 76.62 %.

Il numero delle calorie delle sostanze assorbite fu di 2143.16, cifra che si avvicina a quella media di Rubner di 2868.

Quest'alimentazione mista con pane e latte di pecora è abbondante di grassi, dei quali abbiamo avuto un assorbimento maggiore delle cifre stabilite da Voit 56 % e Moleschott 84 %.

Le calorie in questa alimentazione quasi tutte sono fornite dai grassi (1885-36) mentre le altre sostanze azotate ne danno 382-34 e le sostanze idrocarbonate grammi 675.46.

I grassi, più degli idrati di carbonio, hanno una grande influenza sul ricambio dell'azoto.

Secondo le recenti esperienze di Wicher e Weiscke, 100 grammi di grasso diminuiscono del 30.40 % il ricambio azotato e 100 gm. di amido del 19.21 %.

Quest'alimentazione mista con pane e latte di pecora è insufficiente per l'albumina; però tale insufficienza viene compensata dalla esuberante quantità di grassi che forniscono tante calorie, quante bastano all'organismo.

C. von Noorden osserva che una alimentazione, che contenga un po' meno di azoto ma che soddisfa largamente al bisogno totale di calorie, è preferibile ad una alimentazione abbondante di sostanze azotate accompagnate da quantità di alimenti ternarii (zucchero e grassi) insufficienti a fornire la somma totale di calorie necessarie.

Però è da osservarsi che tale alimentazione, finchè l'individuo non si è assuefatto, produce diarrea e dolori viscerali, come osservai nel mio soggetto, la prima volta che è stato sottoposto a tale regime.

Questi disturbi sono dovuti allo zucchero, ai sali e alla gran quantità di grassi contenuti nel latte (Albertoni e Stefani). In seguito essi scompaiono e l'individuo tollera bene l'uso del latte, come è stato nel mio soggetto.

Terminato l'esperimento su questo tipo di alimentazione interrogai il soggetto per sapere se fosse rimasto soddisfatto. Rispose che tranne la prima sera, nella quale accusò diarrea e dolori viscerali, che poi scomparvero, non ebbe niente a soffrire. Avvertì languore allo stomaco e debolezza generale solamente il primo giorno, preparatorio al periodo dell'esperimento. Nei giorni successivi stette benissimo senza accusare alcun disturbo.

Dai risultati dei miei esperimenti si può concludere che tale alimentazione, mista con latte di pecora e pane, è:

1° *Scarsa di sostanze azotate;*

2° *Deficiente di sostanze idrocarbonate;*

3° *Ricca di grassi che servono a compensare la minore quantità di sostanze azotate ed idrocarbonate, sviluppano un numero di calorie necessarie al mantenimento dell'organismo.*

Per maggiori dettagli vedi in fine le Tabelle I–IV.

SECONDO PERIODO DI ESPERIMENTO.

(*Alimentazione con ricotta e pane bianco*).

Le analisi fatte da G. Sartori su 3 campioni di ricotta pecorina appartenenti ad una sola caseificazione, ma estratti dalle caldaie in 3 riprese diverse hanno dato questi risultati:

COMPONENTI	1° campione	2° campione	3° campione	Media allo stato naturale	Seccata a 100°
			Grammi		
Acqua	43. 80	42. 48	43. 29	43. 29	..
Materie grasse	36. 46	31. 64	33. 31	33. 31	58. 76
Albuminoidi	8. 66	13. 61	11. 73	11. 73	20. 86
Ceneri	0. 72	0. 78	0. 84	0. 84	1. 45
Lattosio	9. 77	11. 16	10. 42	10. 42	18. 37
Acido lattico	0. 59	0. 33	0. 43	0. 43	0. 76

La differenza di composizione che si nota nei 3 campioni, è dovuta alla fase diversa di formazione, nella quale fu presa per essere esaminata. Il primo campione è stato levato dallo strato superiore del contenuto della caldaia dopo di aver sottratta la schiuma superficiale, avendo cura di non disturbare gli strati sottoposti. Poi si tolse il secondo e poi il terzo che è quello strato di ricotta, che trovasi immediatamente in contatto col siero.

Il 5 gennaio sullo stesso soggetto cominciai a studiare il ricambio nell'alimentazione mista di ricotta di pecora e pane.

L'orario dei pasti era lo stesso di quello della precedente alimentazione.

Lo stesso procedimento usavo per raccogliere la ventesima parte del pasto, delle feci e delle urine.

La defecazione si compiva la mattina; le feci erano di colore giallo, di consistenza cremosa e solida.

Per le analisi ho seguìto gli stessi metodi sopraccennati.

Questo regime alimentare è durato 4 giorni.

Media giornaliera del ricambio.

	Razione gr. 919.75	Feci gr. 152.5	Urine cmc. 737	Assimilazione 82.23 %	Perdita 16.76 %	Deficit
	Grammi					
Umidità	421.642	124.276	..	..	..	..
Azoto	10 768	1.671	11.283	84.48 %	15.51 %	0.515
Sostanze azotate .	67.254	10.448	70.793	84.46 %	15.53 %	..
Grassi	188.338	7.328	..	96.64 %	3.81 %	..
Sostanze idrocarbonate.	235.642	3.896	..	94.10 %	1.64 %	..
Ceneri	8.717	4 892	..	43.87 %	56 12 %	..

Le perdite per il cibo in massa furono di gm. 16. 76 %, per le sostanze azotate 15. 53 %, per i grassi 3. 81 %, per le sostanze idrocarbonate 1. 64 %, per le ceneri 56. 12 %.

L'assorbimento delle sostanze azotate è stato dell'84. 46 %, ossia gm. 56. 806; cifra totale media inferiore a quella annessa del Voit e Moleschott. L'assorbimento dei grassi è stato del 96. 64 %, ossia gm. 181. 010 totale media; cifra enorme in confronto a quella del Voit e Moleschott. L'assorbimento delle sostanze idrocarbonate è stato del 94. 10 %, ossia 231. 746 totale media.

Il numero delle calorie assorbite fu di 2866. 42, quante quasi ne stabilisce Rubner (2868).

Questo tipo di alimentazione dà un maggior numero di calorie del precedente, perchè contiene una maggior quantità di sostanze idrocarbonate e di grassi.

Il maggior numero di calorie fu dato dai grassi (1683. 39), poichè ne furono fornite dalle sostanze azotate solo 232. 90 e dalle sostanze idrocarbonate 950. 13.

Riguardo al bilancio dell'albumina, è da notare che nel giorno 5 gennaio abbiamo avuto una maggiore eliminazione di azoto con le urine, cioè una perdita di gm. 5. 578; e una perdita di gm. 2. 136 l'8 gennaio, perdita corrispondente a gm. 0. 515 media giornaliera.

Questa perdita di materiale azotato si può attribuire a variazioni giornaliere e ad un più attivo ricambio dei tessuti. L'individuo in osservazione si manteneva in ottime condizioni di salute, il suo peso

era stazionario, anzi il 6 gennaio presentava un aumento di 200 grammi.

Terminati gli esperimenti ed interrogato il soggetto, se questa alimentazione l'avesse soddisfatto, ha risposto preferirla alla prima, e non ha accusato mai alcun disturbo, nè debolezza di sorta.

Dai risultati dei miei esperimenti si può concludere che tale alimentazione risulta:

1° *deficiente di sostanze azotate;*

2° *scarsa di sostanze idrocarbonate;*

3° *ricchissima di grassi, che vengono a sviluppare un numero tale di calorie, per cui il numero totale raggiunge la quantità necessaria all'organismo normale.*

Per ulteriori dettagli vedi in fine le Tabelle V-IX.

CONCLUSIONI.

Da ciò che precede si può concludere che l'alimentazione del pecoraio romano, sia che nella sua razione entrino solo pane e latte, sia che vi entrino solo pane e ricotta, apparisce insufficiente di sostanze albuminoidi, almeno rimanendo fedeli alle vecchie cifre, prese come testo. Però, tenendo conto della quantità di grasso e di sostanze idrocarbonate, che pure si trovano nella stessa razione e che eccedono sempre le cifre normali, e tenendo conto dell'azione di risparmio che queste esercitano sulle sostanze albuminoidi, si può ritenere che cotesta alimentazione sia sufficiente e, qualche volta, anche esuberante. Difatti, il nostro soggetto, quantunque non abituato ad un' alimentazione sì fatta, si è mantenuto in equilibrio di peso durante tutto il periodo di esperimento ed è stato in ottime condizioni di salute. E così avviene di tutti i pecorai, i quali godono ottima salute e tendono ad ingrassare non solo per effetto della speciale alimentazione, ma anche perchè la fatica, a cui sono sottoposti, non è molto gravosa. In fine gli esperimenti dimostrano che tanto il latte di pecora, quanto la ricotta non esercitano alcuna azione debilitante nel nostro organismo, come la credenza volgare ammette, e per la quale molti rifuggono da cotesti preziosi alimenti.

TABELLA I.

Giorno 1° gennaio 1902. Peso del corpo kg. 63.800

Razione.

1ª.		2ª.		3ª.	
Pane	Gr. 110	Pane	Gr. 35	Pane	Gr. 98
Latte di pecora .	» 535	Latte.	» 545	Latte.	» 505

Pasto		Feci		Urine
Umido	Secco	Umide	Secche	
Grammi				Cmc.
1788	559.039	277	30.864	700

Analisi.

	Pasto	Feci	Urine
	Grammi		
Umidità	1228.962	245.135	..
Azoto	16.888	6.407	11.760
Sostanze azotate.	104.362	40.043	73.500
Grassi.	85.289	9.440	..
Sostanze idrocarbonate	330.945	29.953	..
Ceneri	21.945	4.927	..

TABELLA II.

Giorno 3 gennaio 1902. Peso del corpo kg. 63.500

Razione.

1ª.	2ª.	3ª.
Pane . . . . . . Gr. 115	Pane . . . . . Gr. 100	Pane . . . . . . Gr. 100
Latte . . . . . . » 525	Latte . . . . . » 525	Latte . . . . . . » 475

Pasto		Feci		Urine
Umido	Secco	Umide	Secche	
Grammi				cmc.
1840	491.045	295	53.425	960

Analisi.

	Pasto	Feci	Urine
	Grammi		
Umidità	1348.955	241.575	..
Azoto.	29.922	8.013	17.664
Sostanze azotate.	187.006	50.081	110.400
Grassi.	110.485	4 983	..
Sostanze idrocarbonate	156.602	21.266	..
Ceneri.	7.031	11.614	..

TABELLA III.

Giorno 3 gennaio 1902. Peso del corpo kg. 63.100

Razione.

1ª.	2ª.	3ª.
Pane . . . . . . Gr. 115	Pane . . . . . Gr. 130	Pane . . . . . . Gr. 100
Latte. . . . . . » 525	Latte. . . . . » 510	Latte. . . . . . » 570

Pasto		Feci		Urine
Umido	Secco	Umide	Secche	
Grammi				Cmc.
1950	492.402	275	50 088	160

Analisi.

	Pasto	Feci	Urine
	Grammi		
Umidità.	1459.598	224.912	..
Azoto.	27.703	15.140	13.528
Sostanze azotate.	173.143	94.625	84.550
Grassi.	177.555	8.879	..
Sostanze idrocarbonate	157.661	79.543	..
Ceneri	16.340	10.987	..

TABELLA IV. —

		Quantità totale secca	Umidità	Azoto	Sostanze azotate	Grassi	Sostanze idro-carbonate	Ceneri		
									Totale	Azo
		Grammi								
1° gennaio Peso del corpo kg. 63. 800	Pasto	559. 039	1228. 965	16. 888	104. 362	85. 298	330. 945	21. 945	529. 175	[illegible]
	Feci	30. 864	245. 135	6. 407	40. 043	9. 440	29. 953	4. 927	..	..
	Urine	cmc. 700	..	11. 760	73. 500	..	..	..	..	..
2 gennaio Peso del corpo kg. 63. 500	Pasto	491. 045	1348. 955	29. 922	187. 006	110 485	156. 602	7. 031	438. 620	[illegible]
	Feci	53. 425	241. 575	8. 013	50. 081	4. 983	21. 266	11. 614	..	..
	Urine	cmc. 960	..	17. 664	110. 400	..	..	..	..	..
3 gennaio Peso del corpo kg.	Pasto	492. 402	1459. 598	27. 703	173. 143	117. 555	157. 661	16. 340	442. 314	[illegible]
	Feci	50. 088	224. 912	15. 140	94. 625	8. 879	79. 543	10. 987	..	..
	Urine	cmc. 760	..	13. 528	84. 550	..	...	..	..	..

icerche sul ricambio.

Assorbimento				Assimilazione		Perdite					
ostanze azotate	Grassi	Sostanze idro-carbonate	Ceneri	Azoto	Sostanze azotate	Totale	Azoto	Sostanze azotate	Grassi	Sostanze idrocar-bonate	Ceneri
					Grammi						
64.319	75.858	301.098	17.018	4.647	30.862	30.864	6.407	40.043	9.440	29.953	4.927
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
36.925	105.502	135.330	..	12.257	76.606	53.425	8.013	50.081	4.983	21.266	11.614
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
78.518	108.676	78.118	5.353	14.175	88.593	50.088	15.140	94.635	8.879	79.543	10.987
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

TABELLA V.

Giorno 5 gennaio 1902. Peso del corpo kg. 63.200.

Razione.

1ª	2ª	3ª
Pane . . . . . . Gr. 196	Pane . . . . . Gr. 160	Pane . . . . . . Gr. 180
Ricotta di pecora . » 110	Ricotta . . . . » 100	Ricotta . . . . . » 135

Pasto		Feci		Urine
Umido	Secco	Umide	Secche	
Grammi				Cmc.
955	486.894	255	43.500	920

Analisi.

	Pasto	Feci	Urine
	Grammi		
Umidità	468.106	211.500	..
Azoto	8.774	2.220	14.352
Sostanze azotate	54.837	13.875	87.900
Grassi	213.859	9.908	..
Sostanze idrocarbonate.	207.716	8.747	..
Ceneri	1.708	8.750	..

TABELLA VI.

Giorno 6 gennaio 1902. Peso del corpo kg. 63.400.

Razione.

1ª		2ª		3ª	
Pane	Gr. 180	Pane	Gr. 138	Pane	Gr. 185
Ricotta	» 200	Ricotta	» 123	Ricotta	» 95

Pasto		Feci		Urine
Umido	Secco	Umide	Secche	
Grammi				Cmc.
921	503.079	115	29.655	770

Analisi.

	Pasto	Feci	Urine
	Grammi		
Umidità	477.922	85.395	..
Azoto	11.285	1.707	11.150
Sostanze azotate	70.331	10.668	69.687
Grassi	185.751	11.073	..
Sostanze idrocarbonate	227.851	0.542	..
Ceneri	7.860	5.569	..

TABELLA VII.

Giorno 7 gennaio 1902. Peso del corpo kg. 63.200.

Razione.

1ª		2ª		3ª	
Pane	Gr. 150	Pane	Gr. 145	Pane	Gr. 145
Ricotta	» 150	Ricotta	» 133	Ricotta	» 112

Pasto		Feci		Urine
Umido	Secco	Umide	Secche	
Grammi				Cmc.
928	455.454	120	20.506	630

Analisi.

	Pasto	Feci	Urine
	Grammi		
Umidità	379.546	99.494	..
Azoto	15.980	1.527	10.458
Sostanze azotate	89.875	9.543	65.763
Grassi	123.486	4.101	..
Sostanze idrocarbonate.	292.586	2.804	..
Ceneri	13.983	2.531	..

TABELLA VIII.

Giorno 8 gennaio 1902. Peso del corpo kg. 63 200.

Razione.

1ª		2ª		3ª	
Pane	Gr. 150	Pane	Gr. 150	Pane	Gr. 160
Ricotta	» 155	Ricotta	» 165	Ricotta	» 148

Pasto		Feci		Urine
Umido	Secco	Umide	Secche	
Grammi				Cmc.
928	507.004	120	19.285	630

Analisi.

	Pasto	Feci	Urine
	Grammi		
Umidità	420.996	100.715	..
Azoto	7.036	1.233	9.172
Sostanze azotate	43.975	7.706	57.325
Grassi	230.258	4.225	..
Sostanze idrocarbonate.	214.418	3.492	..
Ceneri	11.317	2.629	..

TABELLA IX.

		Quantità totale secca	Umidità	Azoto	Sostanze azotate	Grassi	Sostanze idro-carbonate	Ceneri	Quantità totale	[illegible]
		Grammi								
5 gennaio peso del corpo kg. 63. 200	Pasto .	486. 894	468. 106	8. 774	54. 837	213. 859	207. 716	1. 708	443. 394	[illegible]
	Feci. .	43. 500	211. 500	2. 220	13. 875	9. 908	8. 747	8. 750	..	..
	Urine .	cmc. 920	..	14. 352	87. 900	..	..	..	..	..
6 gennaio peso del corpo kg. 63 400	Pasto .	503. 078	417. 922	11. 285	70. 331	185. 751	227. 851	7. 86	473. 423	[illegible]
	Feci. .	29. 655	85. 935	1 707	10. 668	11. 073	0. 542	5. 569	..	..
	Urine .	cmc. 770	..	11. 150	69. 687	..	..	..	..	..
7 gennaio peso del corpo kg. 63. 200	Pasto .	455. 454	379. 546	15. 980	89. 875	123. 486	292. 586	13. 983	434. 945	[illegible]
	Feci. .	20. 506	99. 494	1. 527	9 543	4. 101	2. 804	2. 531	..	..
	Urine .	cmc. 630	..	10. 458	65. 763	..	..	..	..	..
8 gennaio peso del corpo kg. 63. 200	Pasto .	507. 004	420. 996	7. 036	43. 975	230. 258	214. 418	11 317	487. 719	[illegible]
	Feci. .	19. 285	100. 715	1. 233	7. 706	4. 225	3. 492	2. 629	..	..
	Urine .	cmc. 630	..	9. 172	57. 325	..	..	..	..	..

cerche sul ricambio.

Assorbimento				Assimilazione		Deficit		Perdite				
stanze zotate	Grassi	Sostanze idro-carbonate	Ceneri	Azoto	Sostanze azotate	Azoto	Totale	Azoto	Sostanze azotate	Grassi	Sostanze idro-carbonate	Ceneri
					Grammi							
. 962	203. 951	198. 969	..	..	..	5. 578	43.50	2. 220	13. 875	9. 908	8. 747	8.750
..	..	..	..	..	..	.	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
'. 663	174. 672	227. 309	2. 291	0. 135	0. 644	..	29. 665	1. 707	10. 668	10. 079	0. 542	5. 659
..	..	..	..	.	..	..	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
). 332	119. 385	289. 782	11. 452	5. 522	24 112	..	20. 506	1. 527	9. 543	4. 101	2. 804	2. 531
.	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
. 269	226. 035	210. 926	8. 688	..	..	2. 136	19. 285	1. 233	7. 706	4. 225	3. 492	2. 629
..	..	..	..	..	.	..	..	..	..	..	..	..
.	..	..	..	..	..	..	..	.	..	..	..	..

Istituto d'Igiene dell'Università di Roma

Ricerche sulla corruzione delle acque dei laghi

pel dott. **ELIO FABRI.**

Non ha guari Frisoni (1) intraprese una serie di analisi chimiche e batteriologiche sulle acque del lago di Bracciano, per conoscerne la purezza nelle varie parti. E concluse che l'acqua della superficie del centro del lago differisce da quella in vicinanza della riva e la stessa cosa si ha anche a profondità diverse.

Era da supporre che così fosse; perchè sulle rive di queste grandi raccolte di acque sorgono ordinariamente città, più o meno popolose, che in esse versano i loro rifiuti, inquinandole e corrompendole.

A me è sembrato di grande interesse conoscere il modo di diffondersi delle acque luride, in queste grandi raccolte, per avere una guida, nel caso che l'acqua di un lago debba servire per uso potabile, nel fare le prese.

Frisoni constatò che le acque del lago di Bracciano sono tanto più pure quanto maggiore è la distanza dalle rive e quanto mag-

(1) Questi Annali, vol. X, 1900, p. 229.

giore è la presa in profondità, però non potè trovare una costanza nella diffusione delle acque luride, per modo che egli, vistele scomparire a pochi mètri, credette che fosse avvenuta una rapida diluzione ed una completa ossidazione di tutte le materie organiche contenute in coteste acque luride.

Sembra inverosimile che ciò sia avvenuto per opera di quei grandi fattori, che presiedono alla depurazione di tutte le acque corrotte, poichè la sedimentazione delle materie sospese, la diluizione delle impurità disciolte, l'azione delle alghe verdi, degli infusori, dei microrganismi, l'ossidazione, quantunque resa più efficace per opera della luce e del calore, agiscono con una certa lentezza e quindi il fatto osservato dal Frisoni non può attribuirsi ad altro che alla precipitazione al fondo delle acque immonde ed alla ritardata diffusione loro nella massa di acqua del lago.

Io ho ripreso l'argomento ed ho voluto conoscere quanto di vero fosse in questa mia supposizione, studiando le acque del lago di Piediluco, nel punto ove imbocca una piccola fogna che raccoglie gli scoli di buona parte del paese, posto proprio sulla riva del lago.

Ricerche chimiche.

Nel mezzo dell'Umbria, all'altezza di metri 374 sul livello del mare, trovasi il lago di Piediluco, che, dal paese posto sulle sue rive, prende il nome (figura 1).

Il lago non è rotondo; ha coste molto frastagliate (figura 2).

La sua lunghezza è di metri 2500;
la larghezza, nel punto più ampio, metri 500;
nel punto più stretto, metri 120;
la circonferenza è di metri 16,805;
la profondità massima è di metri 20.

Una fila di bianche case segue la riva nord e parte di esse si specchiano nelle acque, e parte sono addossate al monte, erto e sassoso, che le domina dall'alto con una semi-diruta rocca.

Il paese ha una popolazione di 1459 abitanti. Un'ampia via proseguente verso l'altipiano reatino, divide in tutta la sua lunghezza il villaggio.

Non esistono colà fogne sulle vie, nè cessi nelle case; le sostanze di rifiuto, gittate fuori dalle abitazioni, si raccolgono sull'unica via e pian piano per appositi sbocchi, arrivano nel lago.

La corrente ordinaria di acqua lurida è però in tanta scarsa quantità che non mi avrebbe permesso di eseguire le mie ricerche, se non fossi stato favorito da una propizia combinazione.

Il 24 dicembre 1900 mi trovava nel paese per cominciare le ricerche, ed in quel giorno che le cucine sono in grande attività, e che i rifiuti sono in

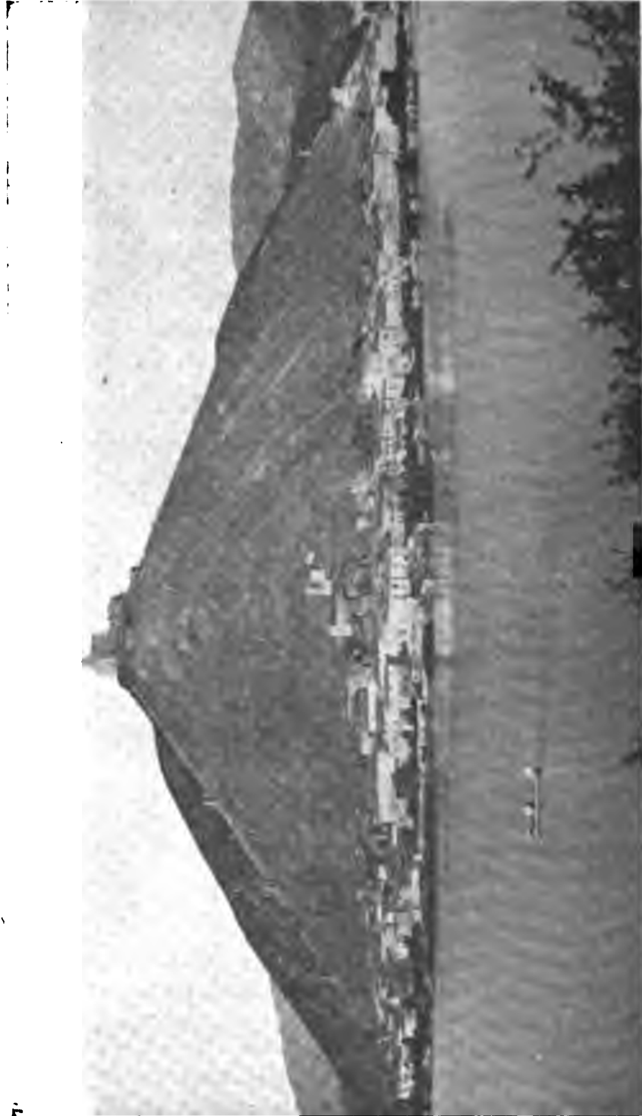


Figura 1.

maggiore abbondanza, potei osservare in un punto della riva scendere nel lago un rivoletto rossastro della portata di litri 3 al minuto primo, con una certa rapidità.

Rilevai la pendenza di questo rivoletto.

Ebbi cioè un dislivello di m. 2.10 su una lunghezza della « rampa » di m. 30 ed una distanza orizzontale di m. 29.90.

Data la colorazione speciale delle acque luride, anche con l'occhio si poteva seguire il loro percorso in seno alle acque limpide del lago.

Esse appena giunte a contatto della superficie cadevano rapidamente al fondo, sul quale compatte si adagiavano per un paio di metri, per scomparire di poi.

Figura 2.

In questo punto segnato con *A* nella (fig. 2) feci la prima presa che fu seguita da altre trenta tutte lungo la linea *A B* fino al mezzo del lago, raccogliendo le acque alla superficie, negli strati mediani e al fondo.

Le prese furono eseguite per mezzo di grossi palloni della capacità di litri 2, lavati accuratamente, prima con acido solforico concentrato e con acqua potabile abbondantemente, poi seccati e chiusi ermeticamente con tappo di gomma sormontata da spirale robusta che dall'alto permetteva a me di far entrare l'acqua nel recipiente alla profondità desiderata.

Dopo fatta la presa i campioni erano portati immediatamente a Terni ove eseguivo le analisi.

Pochi giorni dopo, cioè il 29 dicembre, tornai a Piediluco per prendere nuovi campioni, sia in superficie che in profondità, nei punti (fig. 2) *C, D, F, G, H*, per determinare la composizione media delle acque lontane dal punto più manifestamente corrotto.

Il giorno 24 trovai il lago in perfetta calma, tempo sereno con una temperatura esterna di 14°.

Il giorno 29 il lago era pure in calma, il tempo era sereno, la temperatura esterna era di 14°. 5 C.

Nei giorni precedenti a quelli dei due accessi piovve abbondantemente tanto a Piediluco quanto nella sovrastante valle del Velino.

Prese le temperature a varie profondità ed in varie località per mezzo di sensibili termometri a massimo e minimo si trovò nel fondo la temperatura media oscillante fra 5.1° e 6° C; alla superficie fra 8°.2 e 8.7° C.

Nel mezzo poi del lago si ebbe:

Alla superficie, 8. 4° C.
A profondità media, 7 1° C.
Al fondo, 8. 3° C.

Determinazione della densità. — La densità fu determinata mediante il picnometro a boccetta di Gay-Lussac, della capacità di 25 cmc. servendomi del metódo della doppia pesata.

Le densità furono tutte riferite alla temperatura dell'acqua a 15° C.

Oltre la densità, in ogni campione, feci le seguenti determinazioni:

1. Residuo secco a 180°.
2. Cloro.
3. Ossigeno consumato per ossidare le materie organiche.
4. Anidride nitrosa.
5. Ammoniaca.
6. Anidride nitrica.
7. Previa contaminazione.

Residuo secco a 180°. — Ritenni superfluo determinarlo per tutti i campioni presi sia in superficie che in profondità; mi limitai però a determinarlo nei seguenti luoghi:

a) nelle acque superficiali della riva;
b) nelle acque profonde della riva;
c) nelle acque superficiali ad un metro di distanza dalla riva;
d) nelle acque della superficie a m. 40 dalla riva;
e) nelle acque del fondo raccolte a m. 40 dalla riva ed alla profondità di m. 20;
f) nelle acque superficiali nel mezzo del lago a metri 60 dalla riva;
g) nel mezzo del lago, nell'acqua a metri 10 di profondità;
h) nell'acqua raccolta nel centro del lago, alla profondità di m. 17. 50.

Per la determinazione si usarono 200 cmc. d'acqua che fu fatta evaporare in bagno-maria su capsula di platino pesata antecedentemente.

Il residuo fu seccato in stufa a 180° C. fino a costanza di peso.

Cloro. — Il cloro fu determinato, per via volumetrica, col metodo di Mohr, usando una soluzione normale centesima di nitrato d'argento ed il cromato di potassio come indicatore.

Ossigeno consumato per ossidare la materia organica. — Fu adoperato il metodo di Kubel.

Si preparò prima una soluzione 20 per cento di acido solforico nell'acqua distillata, poi una soluzione N/100 di acido ossalico ed una soluzione di permanganato di potassio corrispondente a quella di acido ossalico.

200 cmc. di acqua si facevano bollire per 10 minuti insieme a cmc. 5 della soluzione di acido solforico e cmc. 10 della soluzione titolata di permanganato.

Poi si aggiungevano cmc. 10 della soluzione ossalica e finalmente, avvenuta la decolorazione, tanto permanganato da ottenere una leggera colorazione rosea.

Dalla quantità di permanganato impiegato in questa seconda aggiunta si determinava la quantità di ossigeno consumato per ossidare la materia organica, moltiplicandolo per 0. 00008.

Le materie organiche furono calcolate moltiplicando l'ossigeno per il coefficiente medio 20.

L'ammoniaca e *l'acido nitroso* furono determinati per via colorimetrica coi soliti procedimenti descritti in ogni trattato di analisi delle acque.

Anidride nitrica. — L'anidride nitrica fu determinata approssimativamente paragonando l'intensità dell'anello bleu ottenuto nella reazione colla difenillammina nell'acqua in esame con quello ottenuto con un'acqua campione contenente un milligrammo di anidride nitrica per ogni centimetro cubico.

Previa contaminazione. — Le rilevanti quantità di ammoniaca, acido nitroso e nitrico traggono origine, lungo la linea *A B*, da contaminazione diretta per sostanze organiche azotate, quindi ho creduto conveniente conoscere di quanto, nei campioni presi, l'azoto superasse 0. 00032, cioè la quantità che costantemente si trova in 1000 parti delle acque anche più pure.

Ho adoperato il metodo proposto da Frankland ed Armstrong, cioè ho diffalcato dall'azoto totale, sotto forma di ammoniaca, acido nistroso e nitrico, contenuti in 100 litri di acqua di ciascuna presa, il coefficiente 0. 032 ed ho moltiplicato il residuo per 10 mila.

I risultati delle mie ricerche sono riuniti nella tabella seguente:

TABELLA I.

Risultati chimici ottenuti nelle analisi delle acque prese lungo la linea AB, cioè dallo sbocco

Densità dell'acqua

LUOGO DI PRESA	Profondità in metri	Distanza dalla riva in metri	Densità	Residuo secco a 180°	Cl.
Superficie.	..	riva	1.00450	137.50	8.5898
Profondità	0.50	riva	1.00460	138	3.550
Superficie.	..	1	1.00322	35	1.48260
Profondità	1	1	1.00390	..	1.48260
Superficie.	..	2	1.00220	..	1.48260
Profondità	2	2	1.00280	..	1.48260
Superficie.	..	3	1.00213	..	1.48260
Mezzo.	2	3	1.00220	.	1.48260
Profondità	3	3	1.00249	..	1.48260
Superficie.	..	4	..	..	1.48260
Mezzo	3	4	..	..	1.48260
Profondità	5	4	..	..	1.77280
Superficie.	..	5	..	..	1.77680
Mezzo	3	5	..	..	1.77680
Mezzo	7	5	..	..	1.77680
Profondità	10	5	..	..	1.77680
Superficie.	..	6	1.00210	.	1.77680
Mezzo	7	6	1.00227	..	1.77680

lla fogna al centro del lago (i valori chimici ottenuti si riferiscono a 100 litri d'acqua).
rida 1.00458.

ssigeno consumato per ossidare a materia organica	N H^3	$N^2 O^3$	$N^2 O^5$	Previa contaminazione
10.7143	31.5	traccie	0.16	18.975
14.229000	12.6	traccie	0.16	10.294
1.87720	12.6	traccie	0.16	10.2904
1.49652	12.9	0.000024	0.18	10.1026089
0.411060	0.042	0.000081	0.18	487.3789
10.35080	0.042	0.000081	1.8	487.3789
0.411060	0.3675	0.000081	1.8	8195.4989
1.297420	0.03675	0.000081	1.8	8195 4989
1.297420	0.03675	0.000081	2.7	10445.4989
0.517540	0.03675	0.000081	2.2	9195.4989
0.69050	0.03675	0.000081	2.2	9195.4989
0.94050	0.03675	0.000066	2.8	10045.4436
0.517540	0.0315	0.000066	2.2	5440.9236
0.69050	0.0315	0.000066	2.2	5440.9236
0.759550	0.0315	0.000066	2.2	5440.9236
0.89432	0.0315	0.000066	2.2	5440.9236
0.69050	0.280	0.033040	1.3	3282.6397
0.69050	0.280	0.01652	1.3	3230.6789

Segue TABELLA I.

Risultati chimici ottenuti nelle analisi delle acque prese lungo la linea AB, cioè dallo sbocc

Densità dell'acqu

LUOGO DI PRESA	Profondità in metri	Distanza dalla riva in metri	Densità	Residuo Secco a 180°	Cl.
Profondità	10. 50	6	1. 00240	..	1. 77680
Superficie.	..	10	1. 00210	..	1. 48260
Mezzo	4	10	1. 00215	..	1. 48260
Mezzo	9	10		..	1. 77680
Profondità	13	10	1. 00230	..	1. 77680
Superficie.	..	40	1. 0025	26	2. 47100
Mezzo	4	40	1. 0026	..	1. 77680
Mezzo	7	40		..	1. 77680
Profondità	20	40	1. 0028	28. 28	2. 47100
Superficie.	..	60	1. 0022	26. 50	1. 77680
Mezzo	10	60	1. 0023	26. 53	2. 47100
Profondità	17 50	60	1. 0023	28 20	2. 47100

Dopo eseguite le ricerche lungo la linea AB, luogo direttamente contaminato dalle acque luride provenienti dal paese, ho creduto dover fare anche l'esame chimico delle acque prese (fig. 2) in C, D, F, G, H, in superficie e a mezza altezza dal fondo, per poter conoscere

a fogna al centro del lago (i valori chimici ottenuti si riferiscono a 100 litri d'acqua).
da 1. 00458.

igeno consumato per ossidare materia organica	NH^3	N^2O^3	N^2O^5	Previa contaminazione
0. 759550	0. 210	0. 033040	2. 2	5774. 5961
0. 110470	0. 315	0. 000066	2. 2	5939. 9036
0 526670	0. 315	0. 000066	2. 2	5439. 9036
0. 632400	0. 315	0. 000066	2. 2	5439. 9036
0. 69050	0. 315	0. 000081	2. 2	5439. 9036
0. 63240	0. 315	0. 000081	2. 2	5439. 9036
0. 69050	0. 03675	0. 000081	2. 2	5483. 1329
0. 69050	0. 03675	0. 000081	2. 2	5483. 1329
0. 69050	0. 0280	0. 000081	1. 8	4411. 0189
0. 548350	0. 0280	0. 033040	1. 3	3282. 6398
0. 548350	0. 0280	0. 033040	1. 3	3282. 6398
0. 548240	0. 0280	0. 01652	1. 3	3166. 1159

quale fosse la costituzione del lago in punti lontani da corruzioni dirette.

I risultati di queste determinazioni sono riuniti nella seguente tabella II:

TABELLA II.

Composizione chimica media delle acque del lago, desunta dalle analisi eseguite sulle acque raccolte in C, D, F, G, H, *sia in superficie, che negli strati mediani e profondi, dopo un periodo di pioggia. (I valori sono stati riferiti a 100 litri d'acqua).*

Luogo di presa	Densità	Residuo secco a 180°	Cl.	Ossigeno consumato per ossidare la materia organica	NH^3	N^2O^3	N^2O^5	Previa contaminazione
Superficie.	1.0020	26	1.580066	0.5254633	0.0315	0.33040	1.466	3772.5169
Mezzo	1.0020	..	1.77680	0.560880	0.024325	0.0413505	1.675	3891.3260
Fondo	1.0024	28.12	1.678873	0.6365266	0.21933	0.27533	1.466	3891.3260

Da essi si vede che il lago è in tutta la sua massa corrotto per sostanze organiche in disfacimento di varia provenienza.

Ciò non fa meraviglia allorchè si consideri che io mi recai nel luogo a prelevare i campioni in un giorno di tempo sereno, in vero, ma dopo un periodo di pioggia caduta abbondantemente sul luogo e nell'altipiano di Rieti da dove provengono i più degli affluenti del lago che in quel tempo scorrevano gonfi e torbidi.

TABELLA III.

Composizione chimica media delle acque del lago, desunta dalle analisi eseguite sulle acque raccolte in F, D, C, *sì in superficie che al fondo, dopo un periodo di tempo bello. I valori sono stati riferiti a 100 litri di acqua.*

Luogo di presa	Strati	Densità	Residuo secco a 180°	Cl	Ossigeno consumato per ossidare la materia organica	NH^3	N^2O^3	N^2O^5	Previa contaminazione
F	Superficie	1.0024	29 60	0.023	0.4662	. .	0.036	0.15	188
	Fondo	1.0031	31.00	0.047	0.5155	traccie	0.039	0.12	120
D	Superficie	1.0023	26.00	0.045	0.4434	. .	0.024	0.16	176
	Fondo	1.0028	27.00	0.049	0.4772	0.008	0.026	0.14	126
C	Superficie	1.0020	26 00	0.050	0.3421	. .	0.022	0.18	211
	Fondo	1.0030	27.20	0.047	0.3907	traccie	0.026	0.17	168

Queste acque meteoriche, lavando i terreni coltivati delle colline che tutto intorno circuiscono il lago, asportano da questi abbondanti quantità di sostanze fertilizzanti che poi per un certo tempo permangono nelle acque del lago.

Ho creduto quindi anche necessario determinare la composizione media di queste acque dopo un periodo di 12 giorni circa di siccità, ed ho ottenuti i risultati esposti nella tavola III, risultati che confermano pienamente la supposizione fatta di sopra circa le cause di corruzione della intera massa d'acqua del lago.

La fig. 3 ci dimostra graficamente ciò che esprimono i numeri della tabella I ove la linea intera si riferisce ai dati dell'acqua attinta in superficie; la linea a tratti e punti ai dati dell'acqua attinta a media profondità; quella a piccoli tratti ai dati dell'acqua attinta in profondità.

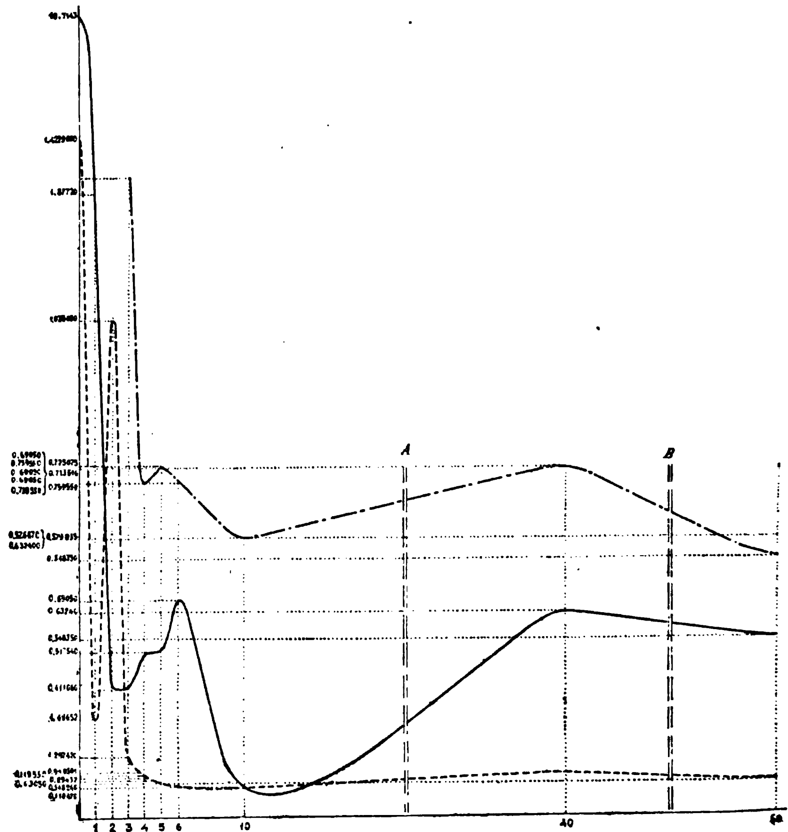


Figura 3.

Ricerche batteriologiche.

Le ricerche intraprese non si potevano dire certamente complete se non fossero state sussidiate da una serie di esami batteriologici allo scopo di stabilire il numero dei germi per centimetro cubo alle diverse profondità corrispondenti alla curva segnata dall'inquinamento dell'acqua rilevato dalle ricerche chimiche.

Perciò gli esami sono stati eseguiti prima lungo la linea (fig. 2) *A B*, cioè dal punto più inquinato verso il centro del lago e nei punti *C D E G H*, cioè nei luoghi ove non era palese la contaminazione.

Le raccolte furon fatte in tempo sereno, ma dopo un periodo di pioggia.

I campioni furono attinti in superficie, prendendoli a 25 cm. sotto il pelo di essa, negli strati mediani e al fondo.

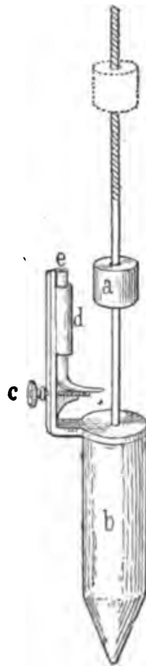


Figura 4.

La prelevazione dei campioni fu eseguita per mezzo di un piccolo apparecchio (figura 4) da me ideato che, sebbene semplice, pone assolutamente le acque prese, al riparo da tutti i possibili inquinamenti esterni.

Esso si compone di tre parti:

1° Di una verga metallica cilindrica che si prolunga al di sopra con una lunga corda giusta — posta ad essa, ed al disotto porta un peso cilindrico-conico suscettibile di essere aumentato o diminuito, a seconda delle profondità alle quali si vuol giungere.

2° Di un peso pure cilindrico traversato in tutta la sua lunghezza da un foro.

3° Di una stretta piastra metallica, piegata ad angolo retto e facente corpo coll'asta cilindrica portante di fianco ed in alto un cappuccetto pure metallico, mentre in basso è fenestrata in senso longitudinale.

In questa fenestratura scorre una piccola mensola lievemente incurvata a doccia nella parte superiore; mensola che può venire fissata in qualunque punto della sua corsa per mezzo di una vite a pressione.

Come recipiente di raccolta ho adoperato piccole provette di vetro cilindriche nella parte inferiore tirate a punta filata e piegate ad angolo retto, nelle quali dopo veniva fatto un vuoto relativo nel modo ordinario come si pratica nelle pipette Tursini-Sclavo-Massa.

Dopo aver chiuso l'estremo alla lampada venivano sterilizzate con cura.

Per far funzionare l'apparecchio si opera così:

Si pone una delle provette nel piccolo tubo (*d*), quindi si innalza la mensola (*c*) nella cui parte superiore a doccia va ad appoggiare la parte filata e piegata ad angolo.

S'immerge poi l'apparecchio tenendo in mano il peso (*a*) pel foro del quale passa la corda che mano mano si va svolgendo.

Giunti alla voluta profondità si abbandona il peso (*a*) il quale lentamente scende lungo la corda prima, poi per l'asta metallica; giunto in corrispondenza della parte filata della provetta ne spezza un piccolo tratto per fermarsi in ultimo sopra la parte piana del grosso peso cilindrico-conico funzionante da zavorra, e viene sempre a trovarsi al di sotto.

Nella provetta, essendo stato fatto precedentemente il vuoto, l'acqua degli strati in cui pesca vi penetra facilmente e rapidamente. Si ritira l'apparecchio, si toglie il recipiente e subito si fonde alla lampada la punta spezzata.

Raccolte le acque, i campioni furono posti in apposita ghiacciaia, e recati in un laboratorio onde si procedè alla semina.

Come substrato nutritivo si adoperò la gelatina, perchè di facile uso e per il vantaggio che ha di far distinguere i germi fluidificanti dai non fluidificanti: la semina fu fatta in capsule di Petri sterilizzate col metodo ordinariamente usato in batteriologia.

Le capsule furono in ultimo poste in luogo oscuro e tenute alla temperatura di 18°-20° C.

Fin dal primo apparire delle colonie fu fatta la conta e ripetuta di giorno in giorno: non potei però protrarla al di là del decimo e dodicesimo giorno per lo sviluppo delle colonie dei fluidificanti.

Ecco frattanto i risultati dell'esame batteriologico, sia lungo la linea *A B* (fig. 2), sia in acque prese in superficie e profondità nei punti *F D C* dopo un periodo di tempo sereno della durata di

giorni 12 circa. Oltre a ciò, nella fig. 5 sono stati schematicamente riuniti i risultati dell'esame batteriologico dettagliatamente notati nelle tabelle IV, V e VI; ove la linea intera si riferisce ai dati ottenuti dall'acqua attinta alla superficie; la linea a tratti e punti ai dati ottenuti dall'acqua attinta a media profondità; la linea a piccoli tratti, ai dati ottenuti dall'acqua attinta in profondità.

TABELLA IV.

Esame quantitativo dei germi esistenti in 1 cc. di acqua presa alla superficie.

Distanza dalla riva	Totale	Schizomiceti				Ifomiceti
		Fluidificanti		Non fluidificanti		
		Cromogeni	Non cromogeni	Cromogeni	Non cromogeni	
Riva	3,530	40	70	3,240	180	20
1 metro . . .	4,357	30	10	2,147	1,170	10
2 metri . . .	3,050	20	20	2,010	1,000	—
3 » . . .	3,180	—	40	1,980	1,260	10
4 »	3,030	30	40	1,000	1,960	10
5 » . . .	2,500	40	—	1,200	1,260	—
6 » . . .	1,190	—	30	1,000	160	—
10 » . . .	1,729	40	9	1,080	600	—
40 » . . .	480	50	10	120	240	—
60 » . . .	320	10	10	186	120	—

TABELLA V.

Esame quantitativo dei germi esistenti in 1 cc. d'acqua presa negli strati mediani.

Distanza dalla riva	Totale	Schizomiceti				Ifomiceti
		Fluidificanti		Non fluidificanti		
		Cromogeni	Non cromogeni	Cromogeni	Non cromogeni	
4 metri . . .	11,610	60	50	10,270	1,230	30
5 » . . .	2,510	30	20	1,200	1,260	10
6 » . . .	1,608	10	28	1,890	680	10
10 » . . .	1,390	50	20	1,200	120	10
40 » . . .	1,480	—	—	1,420	60	—
60 » . . .	780	—	—	720	60	—

TABELLA VI.

Esame quantitativo dei germi esistenti in 1 cc. di acqua presa alla profondità.

Distanza dalla riva	Totale	Schizomiceti				Ifomiceti
		Fluidificanti		Non fluidificanti		
		Cromogeni	Non cromogeni	Cromogeni	Non cromogeni	
Riva	84,110	20	90	42,000	42,000	30
1 metro . . .	81,160	20	50	41,590	40,000	60
2 metri . . .	51,750	20	30	31,200	20,500	30
3 » . . .	39,320	30	80	19,600	19,600	10
4 » . . .	9,170	90	80	8,000	1,000	30
5 » . . .	2,060	60	20	1,260	720	10
6 » . . .	2,079	80	10	1,260	729	10
10 » . . .	2,290	50	20	2,100	120	10
40 » . . .	580	10	90	240	240	10
60 » . . .	940	10	10	140	780	—

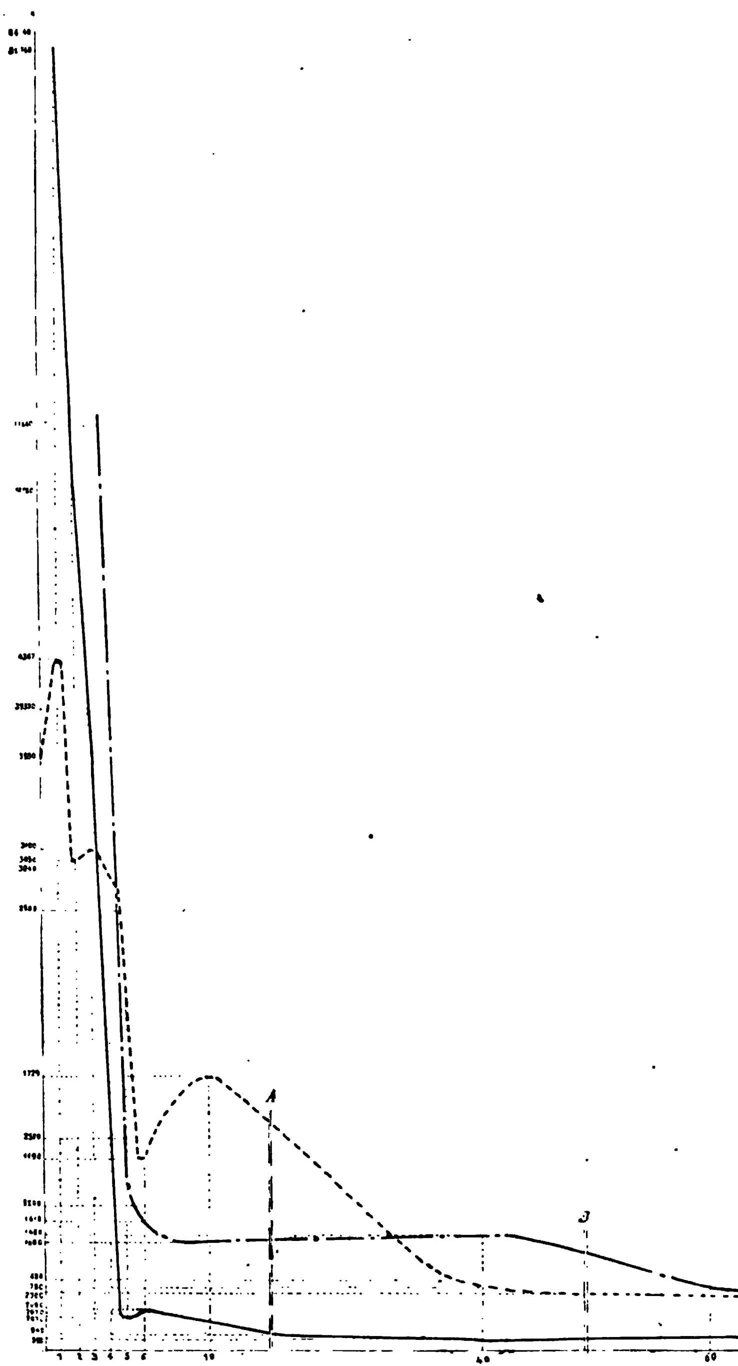


Figura 5.

TABELLA VII.

Media desunta dall'esame quantitativo dei germi esistenti in 1 cc. d'acqua presa dopo un periodo di tempo piovoso in C, D, F, G, H, *sia alla superficie che nelle acque a media altezza dal fondo.*

Luogo di presa	Totale	Schizomiceti				Ifomiceti	Totale generale
		Fluidificanti		Non fluidificanti			
		Cromogeni	Non cromogeni	Cromogeni	Non cromogeni		
Superficie . . .	140	—	10	60	70	—	140
Mezzo	150	20	10	180	40.	—	150
Fondo.	314	10	18	120	126	10	324

TABELLA VIII.

Esame quantitativo dei germi esistenti in 1 cmc. di acqua presa alla superficie ed al fondo nei punti F, C, D, *dopo un periodo di tempo bello.*

Luogo di presa	Strati	Totale	Schizomiceti				Ifomiceti	Totale generale
			fluidificanti		non fluidificanti			
			Cromogeni	Non cromogeni	Cromogeni	Non cromogeni		
F	Superficie . .	27	10	8	..	9	..	27
	Profondità . .	230	100	10	80	40	10	240
D	Superficie . .	30	4	10	16	..	..	30
	Profondità . .	180	60	120	..	..	..	180
C	Superficie . .	52	20	10	12	10	..	52
	Profondità . .	220	40	90	70	20	..	220

Conclusioni.

Dai dati analitici, sopra esposti, risulta:

1° che è vera la supposizione fatta in principio di questo scritto, che, cioè, le acque immonde, che si scaricano in un lago, non si diffondono, in tutta la massa di acqua, se non con grandissima lentezza. Difatti, i due diagrammi, disegnati in base alla quantità di materia organica ed al numero di microrganismi batteriacei, trovati nei vari campioni di acqua, attinti lungo la linea di massima corruzione *A B* ed a profondità diverse, diagrammi quasi identici fra loro, dimostrano che le acque luride, più dense di quelle del lago, non appena imboccate, scendono quasi perpendicolarmente al fondo: là rimbalzano, si sollevano di nuovo alquanto e si diffondono poi regolarmente;

2° che le acque alla periferia del lago, non contaminate apparentemente con rifiuti animali, contengono, dopo un periodo di pioggie abbondanti, discretá quantità di ammoniaca e di acido nitroso, certamente sottratta ai terreni soprastanti e circostanti, coltivati e concimati; e dopo un periodo di bel tempo non contengono più nè ammoniaca nè acido nitroso;

3° che, quando l'acqua di un lago debba servire per uso potabile, il luogo di presa deve essere scelto con grande circospezione, volta per volta ed in base a studi speciali tanto chimici che batteriologici.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Studio batteriologico dell'acqua Marcia dalle sorgenti alla sua distribuzione

Contributo alla batteriologia delle acque sorgive e condotte

per A. CELLI, O. CASAGRANDI e A. BAJARDI.

I. — Introduzione.

È molto usata ed abusata nei laboratori municipali d'igiene la *vigilanza igienica delle acque potabili, mediante l'analisi batteriologica*, periodicamente eseguita, con metodo quantitativo (conta dei batteri) ovvero anche qualitativo (determinazione delle specie batteriche).

Qui a Roma, dal febbraio del 1891 a tutto gennaio 1892, Sanfelice e Oreffice sulle due migliori acque condotte della città (Marcia e Vergine), iniziarono nell'Istituto d'igiene (1) le analisi batteriche metodiche, continuate poi da Santori e Albertazzi (2) e poi da Santori e Faelli (3) nel laboratorio d'igiene del municipio. Così i primi come gli altri osservatori hanno trovato e trovano quasi costantemente, basso, in media da 0 a 50, il numero dei batteri nelle suddette acque di Roma; ogni tanto però e senza che se n'abbiano po-

(1) Questi Annali d'igiene sperimentale, volume II (nuova serie 1902).
(2) *Ricerche igieniche e batteriologiche eseguite dal novembre 1895 a tutto il dicembre 1896, sulle principali acque potabili della città; perizie e ricerche eseguite durante l'anno 1896 nel laboratorio municipale di Roma.* Tipografia Bencini, 1897.
(3) *Quadri di statistica sanitaria* e *Bullettino di statistica sanitaria*, pubblicati dall'ufficio d'igiene del Comune di Roma, 1900 e 1902.

tuto svelare le cause lo vedono salire a sbalzi e certe volte sino a grandi altezze, mentre le specie rimangono quasi sempre le stesse.

Anche in acque meno pure, battericamente parlando, si verificano sempre grandi oscillazioni irregolari del numero dei batteri: ad esempio avviene così nelle nostre acque Felice e Paola e, per uscir da Roma, altrettanto fu osservato anche altrove.

A Parigi (1) il dott. Miquel in tutte le acque condotte, le une (Dhuis, Loing e Lunain) meno ricche di batteri, le altre (Avre, Vanne) più ricche osserva sempre una grande e irregolare oscillazione del numero di questi germi senza però cercarne la spiegazione.

Da una pubblicazione ufficiale (2) della città di Zurigo si ricava che nel 1901, l'eccellente acqua della città conteneva all'origine da 6 a 184 germi, con una media di 32 e nella città invece da 6 a 2448, con una media circa di 171, cioè un numero più che quintuplo di quello delle sorgenti, e, di più, soggetto a molte oscillazioni.

Anche a Milano (3) l'esame batteriologico quotidiano dimostra aumenti improvvisi e straordinari nel numero dei germi conteggiati; ma poichè questi aumenti sono a carico soltanto di una o due specie microbiche, quelle solite dell'acqua, e in altri punti della condottura è piccolo, come d'ordinario il contenuto di germi, le autorità sanitarie non dànno, giustamente, importanza a queste oscillazioni batteriche, ma si guardano bene di farle conoscere al pubblico, perchè secondo i pregiudizi che corrono, s' interpreterebbero sfavorevolmente.

A Torino invece gli aumenti dei batteri nell'acqua condotta del Sangone destano preoccupazioni, reclami, polemiche, litigi, perchè alcune autorità sanitarie li credono senz'altro un'indice indiscutibile di corruzione e inquinamento dell'acqua in ispecie dopo le pioggie e nella stagione calda, in cui, come da per tutto, serpeggia qualche malattia intestinale. E per quanto siasi dimostrato che le analisi batteriologiche fatte in duplice serie dal perito del Municipio e da quello della Società (4) ogni giorno, alla stessa ora ma in due punti diversi, non sempre si corrispondono, e in ogni modo non sono in rapporto diretto con la quantità di pioggia caduta, pure si continua ancora a diffidare della potabilità di detta acqua, perchè il numero dei batteri, per ragioni finora inesplicabili, è sottoposto a notevoli oscillazioni.

Così a Bologna si è destata recentemente, e non è ancora sopita, una viva polemica sulle condizioni igieniche e sanitarie dell'acquedotto civico (5).

---

(1) Annales de l'Observatoire municipal. Paris, Tomo II e III, 1901 e 1902.

(2) Citato da Bordoni Uffreduzzi, loc. seg.

(3) BORDONI UFFREDUZZI, *Sull'acqua condotta di Milano*. Rivista d'igiene e sanità. Torino, 1899.

(4) Società per la condotta di acque potabili. Memoriale all'onorevole Consiglio comunale di Torino, 1902.

(5) PAGLIANI e BADALONI. *Relazione sulle condizioni igieniche e sanitarie dell'acquedotto di Bologna*. Bologna, 1902. — Lettera dell'avv. Bacchelli, in risposta alla relazione precedente. Bologna, 1903.

BRAZZOLA. *L'acquedotto di Bologna in rapporto all'igiene, specialmente alle forme tifoidi*. Bullettino delle scienze mediche, maggio 1903, fascicolo 5°, Bologna.

Uno dei punti di accusa è fondato, al solito, sulle ampie oscillazioni del numero dei batteri; per cui s'arrivò a sospettare che il terreno soprastante non sarebbe un filtro, ma un crivello, cioè incapace di purificare le acque di pioggia; e con questo eventuale inquinamento avrebbe avuto nientemeno diretto rapporto una epidemia tifica nel 1891, che si aggirò specialmente fra la popolazione militare.

Cosicchè, *le eventuali, e talora molto ampie, oscillazioni numeriche dei batteri delle acque potabili eziandio le più pure hanno dato origine persino a sospetti di eventuale corruzione e inquinamento delle sorgenti, e ad allarmi nel pubblico e a dubbi nell'animo delle stesse autorità sanitarie, specialmente quando coincideva una qualche recrudescenza di malattie intestinali.*

Si è così giunti anche a dubitare che due acque tanto invidiabili per la purezza loro, come la Marcia e la Vergine, fossero o potessero divenire inquinate! E furono perciò dalle autorità superiori nominate commissioni speciali, che perlustrassero e vigilassero l'Acqua Marcia dalle sue più remote origini alla sua distribuzione in città.

Eppure fin dal 1885 (1) uno di noi studiando appunto la batteriologia delle acque condotte e di quelle del sottosuolo di Roma, dimostrò che la Marcia e la Vergine erano batteriologicamente purissime alle scaturigini; e in ogni modo nel giudizio di potabilità non potea farsi calcolo esclusivo del numero dei batteri, ciò che gli igienisti più ragionevoli hanno poi confermato ed accettato. Anche l'ufficiale sanitario del Comune, il dott. Gualdi, colle sue belle ricerche sulla febbre tifoide (2) dimostrava poi l'assoluta indipendenza di questa epidemia dalle acque condotte, e da quella Marcia in ispecie.

Ciò bene assodato e messo fuori ogni dubbio, rimanevano pur sempre a conoscere le *vere cause delle eventuali oscillazioni numeriche dei batteri in acque purissime*, come la Marcia e la Vergine, e mentre pregavamo i colleghi dell'Ufficio d'igiene a occuparsi di questa seconda, che è municipale, intraprendemmo fin dal 1899 uno studio sulla prima, e veniamo ora ad esporre, il più brevemente possibile, i risultati.

Il problema che ci siamo proposti di risolvere si può mettere in questi termini generici: *Le cause dell'aumento del numero dei batteri d'un'acqua potabile sono endogene od esogene? In ogni caso*, agiscono

---

(1) Celli. *Relazione dell'analisi batteriologica delle acque del sottosuolo di Roma*. Bullettino della Commissione speciale d'igiene. Roma, 1886.

(2) *La febbre tifoide a Roma. Notizie epidemiologiche*. Roma, 1901.

già alle origini reali o alle scaturigini apparenti dell'acqua, ovvero durante il suo percorso in lunghi acquedotti?

Il problema è d'interesse generale per l'igiene pratica, e a risolverlo si presta benissimo lo studio della condottura dell'acqua Marcia.

Esaminammo perciò metodicamente quest'acqua dalle sorgenti alle ultime diramazioni terminali della condottura e in varie condizioni dell'ambiente: cioè *durante le pioggie estive e durante il disgelo delle nevi in montagna; durante le pioggie autunnali, torrenziali con inondazioni della Valle dell'Aniene, e del piano delle scaturigini; ad aria esterna pura o polverosa.*

E ovunque era possibile esaminammo non soltanto l'acqua in superficie e in profondità, nel centro e alla periferia della corrente, ma eziandio il *materiale raccolto o raschiato* dalle pareti, dalla volta e dal fondo delle opere di presa e degli acquedotti, ed in ogni punto di arresto dell'acqua nella tubolatura.

Per quanto ci consta uno studio simile non venne mai fatto per nessuna condottura di acqua potabile (1).

II. — Storia dell'acqua Marcia (2).

a) Genesi delle sorgenti - Origini reali. — Il bacino del fiume *Anio* fu il grande serbatoio onde gli antichi addussero quasi tutte le acque per Roma. Ad eccezione degli acquedotti Traiano e Alseatino che provenivano dai monti Sabatini, tutti gli altri si alimentavano da sorgenti del bacino dell'Aniene, e cioè dal bacino inferiore provenivano le acque *Virgo*, *Alexandrina*, *Julia*, *Appia*, *Tepula*, ecc., dal bacino superiore le acque *Claudia*, *Anio vetus*, *Anio novus* e *Marcia*.

A 4-6 metri sotto il livello delle odierne sorgenti di quest'ultima giacciono, in vari ordini ancora sepolti nelle successive alluvioni dell'Aniene, gli antichi acquedotti che con piccolissime pendenze corrono per qualche chilometro parallelamente al corso del fiume dove si scaricano.

Il bacino superiore dell'Aniene (vedi Tav. XI) comprende i monti Lucani, Simbruini, Tiburtini e i monti di Filettino e di Trevi nel Lazio: misura in

---

(1) H. Mastbaum ha studiato semplicemente l'influenza di una lunga condottura sulle variazioni della composizione chimica dell'acqua. V. Zeitschrift f. angewandte Chemie, 1901.

(2) Tutte le notizie tecniche sulla origine, presa e condottura dell'acqua Marcia sono tolte quasi integralmente da una interessantissima memoria inedita di Tommaso Sinibaldi, ingegnere capo della Società per l'acqua Marcia. All'eminente Direttore esprimiamo qui ancora una volta i più vivi ringraziamenti anche per tutti i preziosi aiuti e consigli che ci ha fornito durante il lungo nostro lavoro.

superficie 683 Kmq. e comprende secondo Zoppi (1) di terreni permeabili Kmq. 479, semi-permeabili Kmq. 112, impermeabili Kmq. 72.

Una così vasta zona di terreni permeabili onde hanno origine sorgenti assai copiose, come, fra le altre, quella dell'acqua Marcia, è costituita dal calcare cretaceo che principiando da Arsoli forma senza interruzione l'ossatura dei monti di Oricola (809), Cervara 1490, Calvo (1590), Camposecco (1494), Vallecorsa (1803), Serrasecca (1793), Tarino (1959), Cotento (2014), Viglio (2158), Viperella (1838), ecc.

Si noti che in questo altipiano appenninico da Arsoli all'estremo del bacino, segnato dal monte Viperella, trovasi un corso d'acqua (vedi Tav. XI) quasi parallelo a quello dell'Aniene, il così detto Fioio o Turano ad un'altezza di 750-1500 metri sopra le pianure delle scaturigini apparenti dell'acqua Marcia, con un bacino permeabilissimo, con ampie conche (quella solo di Camposecco misura 14 Km. di superficie) con frequenti inghiottitoi, così detti divoracci, e senza altre manifestazioni di importanti sorgenti, tanto che ad Arsoli, sulle arenarie impermeabili che ne sbarrano il corso, è pressochè all'asciutto.

E mentre le sorgenti dell'alto Aniene che formano il *caput aquae* di questo fiume, hanno un regime di portata estremamente variabile, cosicchè sono dovute, senza dubbio, a un bacino prossimo ed immediatamente superiore al luogo della loro manifestazione ossia al bacino imbrifero dell'alto Aniene, invece le sorgenti dell'acqua Marcia (vedi Tav. XII) e quelle limitrofe di Arsoli e Agosta hanno variazioni piccolissime di portata e risentono l'influenza della pioggia e dello squaglio delle nevi dopo un lunghissimo tempo.

E poichè fra le dette sorgenti, già soltanto quelle dell'acqua Marcia hanno una portata di circa 10 mc., bisogna per necessità pensare a un bacino sotterraneo di alimentazione molto più esteso che quello imbrifero e superficiale dell'alto Aniene, cioè al bacino imbrifero e sotterraneo del già detto Fioio o Turano, confluente del Velino.

Dunque i corsi sotterranei che alimentano questo fiume di acque sorgive devono svilupparsi per grandi lunghezze, ed avere la loro origine a molti chilometri di distanza dal luogo delle sorgenti (2).

L'acqua Marcia, del resto, Plinio avea già detto che: *oritur in ultimis montibus Pelignorum*; e il Blumensthil (3) che nel 1865 pensò di ricondurla

---

(1) Carta idrografica dell'Italia. *L'Aniene*. Roma, 1891.

(2) Questo fenomeno geologico idraulico delle origini dell'acqua Marcia non è il solo che si conosca.

Dai preziosi volumi della carta idrografica italiana, opera insigne iniziata e avviata dal compianto ing. Zoppi e proseguita da E. Perrone del Ministero di agricoltura, risulta che dalle viscere delle montagne dell'Appenpennino fuoriescono parecchi di questi abbondanti corsi di acque sotterranee che vengono da grandi distanze a far mostra nelle valli.

Citeremo ad esempio le sorgenti sotto Narni per 13 mc.; le sorgenti delle Paludi Pontine alle falde dei Lepini per circa 16 mc.; le sorgenti che sotto il Monte Cassino sgorgano nell'ingente massa di circa 20 mc.

Sono tutti veri fiumi di acqua sorgiva che provengono da estesi e distanti bacini montani.

(3) *Brevi notizie sull'Acqua Pia.* — Roma, 1870.

a Roma, la fece provenire dal monte Autore e dai piani di Camposecco; l'ing. Sinibàldi vi comprese anche il più alto bacino delle origini del Fiojo; e l'ing. Zoppi (1) accettò e fece suoi gli studi profondi del geniale direttore tecnico dell'acqua Marcia.

E appunto dai volumi della carta idrografica d'Italia ricaviamo due figure che espongono e confermano quanto sopra.

La figura 1 ci dà uno schema delle sorgenti dell'acqua Marcia (2). Si

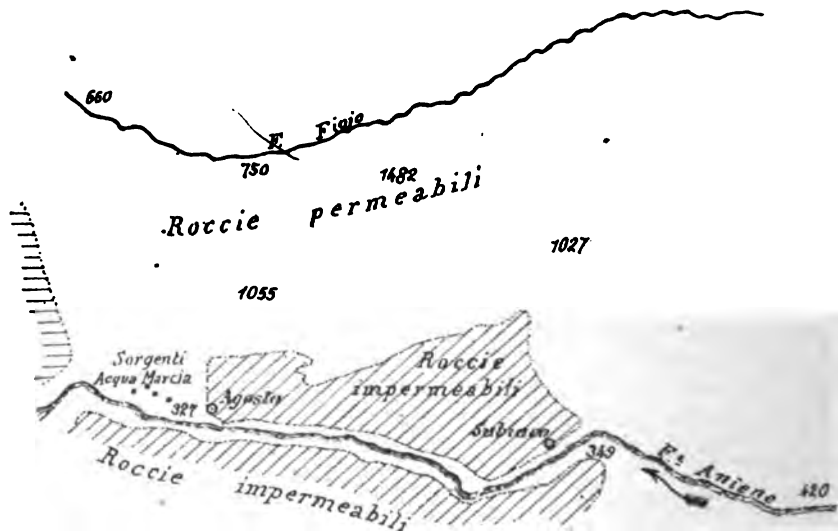


Figura 1.

vede in alto a 660-750 m. d'altitudine il letto del fiume Fiojo o Turano, e in basso, a 327-420 m., il letto del fiume Aniene: fra l'uno e l'altro fiume è interposto un bacino montuoso e ampio a roccie permeabili sotto le quali appaiono, al disotto di Agosta, le scaturigini dell'acqua Marcia presso il fiume Aniene, il quale si vede, in tutto il restante suo letto, scorrere tra rocce impermeabili.

---

(1) Loc. cit.
(2) Carta idrografica ecc. *Liri - Garigliano.*

La figura 2 ci dà una sezione geologica passante (1) per le sorgenti dell'acqua Marcia.

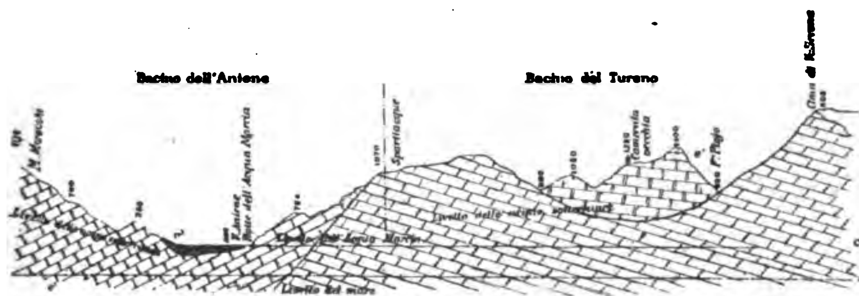


Figura 2.

Si vede a destra il bacino del Fiojo o Turano, confluente del Velino, a sinistra il bacino dell'Aniene: il bacino del Turano si estende dalla cima di Vallevona allo spartiacqua verso l'Aniene, ed è perciò molto più ampio del bacino di quest'ultimo fiume; esso contiene a sua volta altre grandi valli e conche di raccolta dell'acqua; a vista d'occhio si scorge che il più piccolo bacino dell'Aniene da solo non potrebbe alimentare sorgenti così copiose come quelle che nella valle, alle falde dei monti, scaturiscono da Agosta fino ad Arsoli.

Nella stessa figura 2 sono dal basso in alto indicati: il livello del mare, il livello a cui sgorgano le sorgenti dell'acqua Marcia, e il probabile livello delle acque sotterranee che dal fondo del bacino del Turano scendono ad alimentarle.

Questo bacino montuoso è ricoperto di estesissimi boschi ancora ben conservati, e, ad eccezione del piccolo villaggio di Camerata, è sprovvisto di abitazioni.

Il bacino dunque che alimenta le sorgenti dell'acqua Marcia, nella sua massima parte si eleva ad altezze che variano dai 700 ai 1800 metri sul livello del mare (dalle sorgenti circa 400-1500 metri).

Le acque delle precipitazioni atmosferiche devono perciò subire una filtrazione di vari mesi prima di arrivare a scaturire all'aperto.

b) Regime delle sorgenti dell'acqua Marcia. — L'ing. Sinibaldi ha raccolto per una lunga serie di anni tante e così precise osservazioni, come credo non se ne siano messe insieme ancora per nessuna altra acqua sorgente.

Oltre a tener conto dei pluviometri di Tivoli e Subiaco, ne ha impiantato uno a Vallepietra nell'alto Aniene e uno nella casa di guardia delle sor-

(1) Carta idrografica ecc. *Aniene*.

genti, e qui fino dal 1889 ha posto all'unione delle varie acque sorgive una *stazione idrometrica con apparecchio scrivente autoregistratore.* Quest'apparec-

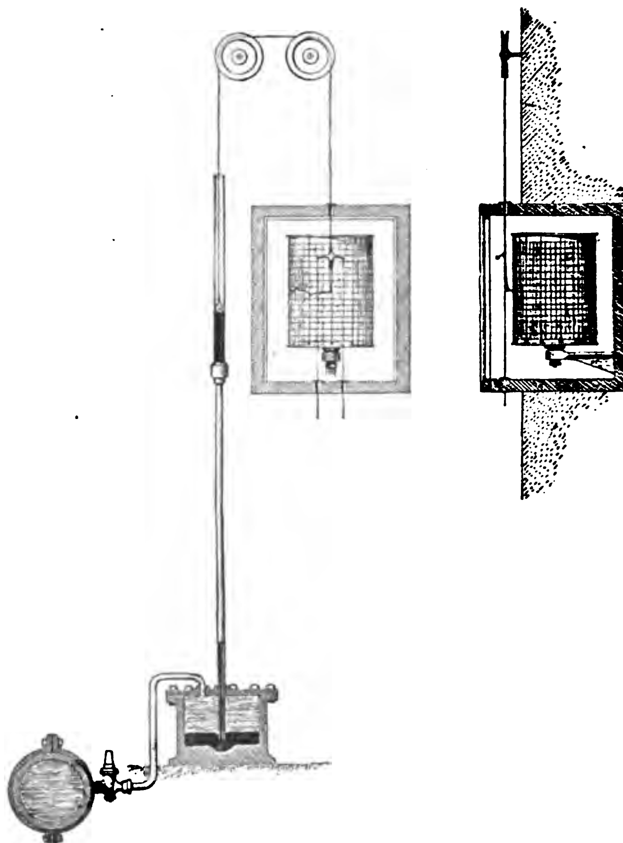


Fig. 3.

chio (fig. 3) consta di un galleggiente che pesca in una vaschetta comunicante con l'acquedotto: dal galleggiante parte un filo, che, attraverso a due carrucole scende ad attaccarsi e a far muovere una penna scrivente sulla carta quadrata che circonda un cilindro dotato di un movimento uniforme, della durata di una settimana. La sensibilità di quest'apparecchio è tale che graficamente si registrano anche le variazioni di più piccola portata (1).

---

(1) Simili apparecchi non dovrebbero mancare in nessuna sorgente e condottura di acqua potabile; questo è il più esatto e sensibile modo di valutare qualsiasi, anche leggera, variazione.

Dai diagrammi così raccolti, istante per istante, e messi in confronto con le precipitazioni atmosferiche nel bacino imbrifero (Subiaco, Vallepietra), per la serie degli anni 1889-98 si deduce che *il regime delle sorgenti dell'acqua Marcia non subisce alcuna variazione brusca in nessun periodo dell'anno* (vedi Tav. XIII). Si ha cioè gradatamente e quasi insensibilmente un solo periodo annuo di aumento che raggiunge il massimo sempre tra il maggio e il luglio, generalmente in giugno, e ciò comunque siano cadute le piogge.

Dal luglio comincia il periodo della diminuzione che gradatamente e insensibilmente prosegue fino al febbraio dall'anno successivo.

Ma queste variazioni sono poco, per sè, rilevanti, sia da un anno all'altro, sia anno per anno.

La portata massima nell'ultimo decennio si verificò negli anni 1892, 1895 e 1897-98, la minima nel 1889-91 e nel 1893-94, la minima assoluta nell'ottobre e novembre 1891 nella misura di once 5100 = mc. 102,000.

Il rapporto della portata minima con quella massima, verificatosi in 10 anni, fu solo di 1:1.50; il rapporto massimo di variazione tra il massimo e il minimo di uno stesso periodo annuo fu di 1 28:1; negli anni di portata ordinaria è di circa 1.12:1 e nelle annate di magra scende anche più in basso.

Sicchè *trattasi di un fiume quasi costantemente perenne di acque sotterranee* (1).

Un regime tanto singolare della portata di sorgenti così copiose può dar campo a molte ipotesi e congetture sulla forma del bacino, sull'alimentazione del medesimo, sulla varia permeabilità delle roccie, sulla varia velocità con cui può filtrare e sui modi come si può distribuire e ridurre in grandi serbatoi sotterranei la pioggia caduta, sull'influenza delle nevi e su tante altre condizioni meteoriche e geografiche, e senza entrare nel campo delle ipotesi una sola conseguenza è certa e conferma quanto fu detto nel paragrafo precedente: cioè il bacino di origine delle sorgenti deve essere molto esteso e molto lontano dal luogo delle

c) SCATURIGINI DELL'ACQUA MARCIA. — Risalendo l'Aniene da Tivoli si percorre per circa 20 chilometri una vallata stretta e chiusa fra monti e fiume; però sotto i villaggi di Anticoli Corrado e Roviano la valle si allarga in pianura di una lampiezza di circa 5 chilometri fino sotto il villaggio di Agosta (vedi Tav. XI e XII). Questa pianura riveste tutti i caratteri riconosciuti dal Belgrand per una località di sorgenti da terreni permeabili; e

---

(1) Secondo Zoppi (vedi Carta idrografica d'Italia. *Liri-Garigliano*, ecc., pag. 121) è evidente che la regolarità di una sorgente cresce col crescere del tempo impiegato dalle molecole acquee di pioggia caduta nel suo bacino ad arrivare per vie sotterranee al punto di scaturigine.

Infatti, se questo tempo fosse più di un anno la sorgente non risentirebbe che di ben poco la influenza della irregolarità della pioggia durante l'anno. Se il tempo fosse di 6 mesi non si risentirebbero che di ben poco le siccità estive ed autunnali, che rarissimamente durano tanto. Se il tempo fosse di un mese è chiaro che basterebbe una siccità di oltre un mese perchè le sorgenti si asciugassero.

Questo tempo è inoltre in funzione del grado di permeabilità del terreno, delle distanze da percorrere sotterraneamente, ed anche della pendenza dei fili acquei sotterranei.

difatti nel percorso di così pochi chilometri scaturiscono sorgenti copiosissime per 8-10 mc. al 1″.



Figura 4.

Non tutte però sono allacciate: quella sotto Agosta (fig. 4) forma subito un corso d'acqua; l'altra detta delle mole di Agosta (fig. 5) forma un lago artificiale dal cui salto vien mosso un molino. Seguitando a scendere da Subiaco la valle dell'Aniene incontriamo le sorgenti dell'acqua Marcia (vedi Tav. XI e XII). Queste, non ancora tutte allacciate, sono le Rosoline, le Serene, 4ª, 3ª, 2ª e 1ª e le sorgenti dell'antico lago di Santa Lucia (fig. 6).

Tutte queste acque sorgive escono a m. 318 circa sul livello del mare, ai piedi dei monti della Prugna, ripidissimi, rivestiti di boschi, privi di abitazione e di ogni coltura. Si manifestano attraverso i detriti calcarei che sembra abbiano ricoperto ed ostruiti i canali, per dove in origine sboccavano all'aperto dalla roccia viva, e sono respinte e contenute dai depositi argillosi, impermeabili, provenienti dalle inondazioni dell'Aniene, che formano la pianura suddetta; col sondaggio fino a 22 metri di profondità, il terreno della pianura si è rinvenuto sempre della stessa composizione argillosa; eguale profondità hanno i depositi dei detriti di massi e breccie provenienti dai monti.

d) Allacciamento delle acque sorgive (Tav. XI e XII). Modi di allacciamento (1). — Fu continuo il progresso tecnico nelle opere di presa delle sorgenti.

---

(1) Dalla citata monografia inedita dell'ing. Sinibaldi.



Fig. 5.

La prima ad essere allacciata nel 1865 fu la 2ª Serena della portata di circa 1 mc. La fig. 7 ci dà la veduta esteriore dell'edificio di presa. La fig. 8 ce ne dà la sezione. Si vede come sopra le varie polle o sorgenti furono costruiti degli acquedotti con pareti a secco, coperti da volte in muratura, in forma cioè di grandi drenaggi, che le raccolgono e le riuniscono in una gran mostra cioè in una botte o edifizio circolare e a cupola, dal quale ha origine il 1° od antico acquedotto.

Sopra i drenaggi fu costruita una platea murata ricoperta di uno strato di terra alto m. 1.20. Le pareti interne della botte (fig. 9) sono umide, variamente colorate e come vischiose; a livello della porticina esterna c'è un ballatoio in ferro che gira internamente tutta la botte e serve pel servizio; dalla parte opposta ai drenaggi si ha la bocca dell'acquedotto vecchio.

Nel fondo dell'edifizio (fig. 9) ove affluiscono le acque come in un lago si vede un deposito di sabbia calcarea finissima che le acque insensibilmente trascinano per disgregazione delle roccie interne, e venendo all'aperto decanta, e seguendo le varie correnti si accumula in forma elegantemente ondulosa di valli e monti: in più di 30 anni se n'è formato un banco dello spessore massimo di circa centimetri 20, e della composizione chimica seguente:

Ossido ferrico, 2.17 per cento;
Silice e silicato, 7.19 per cento;
Carbonati terrosi, 90.44 per cento.

Nel 1885 fu allacciata la 1ª Serena della portata di circa 125 litri al 1″, e nel 1887 una parte del gruppo della 3ª Serena della portata di circa litri 250. Gli allacciamenti furono fatti col sistema dei drenaggi: l'opera



Figura 6.

muraria è (fig. 10) semplicissima, essendosi abolita la mostra o la botte di raccolta.

Dal 1898 in poi si fecero nuove e più importanti opere di presa.

Per allacciare le altre sorgenti del gruppo della 3ª Serena fu costruita una diga, fondandola su terreno impermeabile, ed intestandola alla roccia viva del monte, ai piedi del quale scaturiscono le dette sorgenti, che vengono così ad essere imprigionate fra la diga e la roccia.

Una particolare menzione per le difficoltà incontrate e per la perfetta riuscita tecnico-igienica merita l'allacciamento delle sorgenti del lago di Santa Lucia (fig. 6). Quivi tutte le sorgenti si riunivano e sgorgavano in un piccolo lago di meraviglioso color celeste, della superficie di mq. 1520

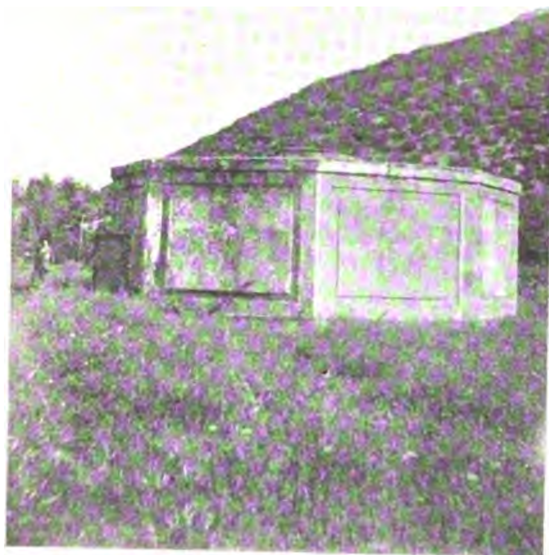


Fig. 7.

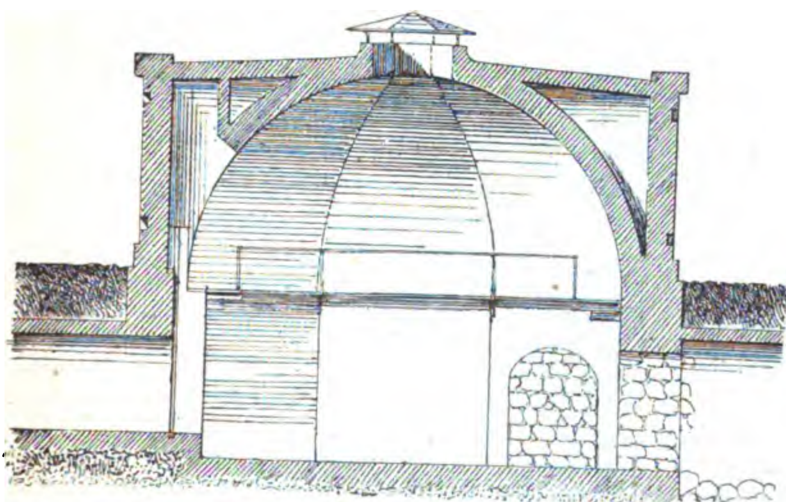


Fig. 8.



Fig. 9.

circa, con sezione verticale ad imbuto e col vertice profondo circa m. 7.50 sotto il pelo dell'acqua.

Le sponde del lago erano formate a valle dalle arene argillose alluvionali del fiume, a monte da profondi banchi di terreni detritici sui quali correva la strada provinciale per Subiaco: le sorgenti sgorgavano tra i detriti calcarei, sottopassavano la strada per alimentare il delizioso lago.

L'ing. Sinibaldi, anzitutto, determinò la linea dorsale dei livelli dell'acqua sotterranea, e lungo questa progettò dentro le roccie l'escavazione di gallerie d'allacciamento, che dovevano far capo a un canale collettore da scavarsi alle falde del monte soprastante.

Il lavoro di escavazione e di muratura delle gallerie riuscì oltremodo difficile. Nella galleria principale dopo circa 12 metri di avanzamento fu trovata una diga di puddinga, spillante acqua da ogni fessura e con tale forza che indicava l'altezza del bacino profondo, sotterraneo, d'alimentazione. Perforato, dopo molte difficoltà, lo spessore di circa metri 2 di una tale puddinga, si ebbe una portata di circa 500 litri al 1″, e la galleria fu proseguita per altri 10 metri fin dove cessava ogni traccia di acqua.



Fig. 10.



Fig. 11.

Nelle altre gallerie si presentarono minori difficoltà e fu trovata minore quantità d'acqua. Da tutte le gallerie le acque sgorgano dalla platea, vengono quindi da maggiore profondità e forse dalle massimo profondità del lago.

L'accesso alla galleria è dato dal piccolo trombino, che è quasi a fior di terra (fig. 11) e si mantiene ermeticamente chiuso.

La fig. 12 ci dà la veduta del piano soprastante alla galleria: a sinistra si vede l'edificio di accesso all'acquedotto nuovo, che unisce le acque delle varie sorgenti; a destra si vede appena il trombino di accesso alla galleria: esso è l'unico rappresentante esteriore dei grandi lavori sotterranei di allacciatura delle sorgenti.



Fig. 12.

Dell'antico lago di S. Lucia restava intanto la parte più profonda fino a m. 7.00 dal piano di campagna con forma di un cono rovescio, con la luce elittica di m. 18 × 26; dal vertice del cono scaturiva sempre una sorgente di circa 100 litri. Per allacciare quest'ultima (figg. 6 e 13) l'ingegnere

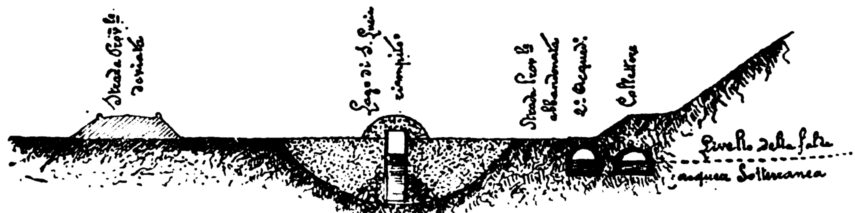


Fig. 13.

Sinibaldi immerse un tubo di cemento armato del diametro di 2 m. col suo asse in coincidenza dell'asse verticale del corso del lago; finito il lavoro di immersione, le acque si sollevarono nell'interno del tubo per circa 80 cm.

sopra il livello dell'acqua esterna del lago, e così furono riunite ed immesse in un canale sfioratore e collettore.

Il lago fu riempito di buona terra argillosa, la strada provinciale si spostò a valle sopra un riporto di terreno battuto, in modo da isolare e chiudere il luogo delle scaturigini.

L'allacciamento della 4ª Serena, o sorgente dell'Oppio, è appena iniziato; quest'acqua esce dalla viva roccia sotto cui trascorre la strada provinciale.

Le Rosoline, cioè le sorgenti più a monte non sono allacciate ancora.

e) Opere di difesa delle scaturigini: sono muri a secco lungo i confini, colmate di terra, piantagioni, cunicoli in muratura per lo scolo delle acque superficiali scorrenti dai monti, e robusti argini di terra per contenere le inondazioni dell'Aniene.

Del resto, il terreno attorno alle sorgenti è pressochè impermeabile, essendo composto di terra argillosa, e perciò attraverso di esso i disperdimenti sono difficilissimi. Una grande causa di disperdimento fu riscontrata invece negli acquedotti antichi de' quali sopra fu detto: convenne troncarli e chiuderli a profondità di 5 o 6 metri sotto acqua adoperando dei cassoni ad aria compressa ricuperabili.

f) Temperatura: in tutte le acque sorgive è sempre uguale e costante a 9 centig. in tutte le epoche dell'anno.

g) Composizione chimica: l'acqua Marcia fu più volte chimicamente analizzata.

Riportiamo qui i risultati dell'analisi fatta nel 1884 da Mauro, Nasini e Piccini nell'Istituto chimico di Roma diretto dal prof. Cannizzaro.

Tabella *A*.

Su 100,000 parti:

Residuo totale a 100°	29.64
Residuo totale a 180°	28.60
Durezza permanente	6.57
Id. temporanea	20.95
Ossido di calcio	11.00
Id. di magnesio	3.28
Id. di potassio	0.20
Id. di sodio	0.45
Id. di ferro	traccie
Anidride solforica	0.26
Id. silicilica	0.67
Cloro	0.39
Iodio	traccie
Anidride nitrica	0.28
Id. nitrosa	0
Ammoniaca	0
Idrogeno solforato	0
Quantità di O consumato	0.0032
Anidride carbonica	25.35
Id. id. libera e semicombinata	14.28
Ossigeno	739
Azoto	1400

Ultimamente, nel 1892, il prof. Paternò ebbe ad analizzare le sorgenti S. Lucia, 4ª Serena e la riunione delle Serene.

Quest'analisi non fu ancora pubblicata; ma in generale possiamo dire che *prese all'ingrosso le 2 analisi, quella del 1884 e quella del 1902, si corrispondono.*

Prima di passare ad esporre i risultati delle nostre numerosissime ricerche batteriologiche ci fermeremo ai

III. — Metodi per l'analisi batteriologica dell'acqua.

1. Raccolta dei campioni. — Siccome occorreva esaminare il contenuto batteriologico dell'acqua nelle più diverse condizioni di presa, cioè alle sorgenti, negli acquedotti, nei serbatoi, negli sbocchi, ecc., e in molti di questi punti sia in superficie che in profondità, a massa d'acqua tranquilla e a massa d'acqua corrente, così siamo stati anzitutto costretti a prendere in esame i vari apparecchi per la presa dei campioni d'acqua a scopo batteriologico a portata di mano e a profondità più o meno rilevanti, a massa d'acqua tranquilia e a massa d'acqua corrente, per vedere se tra essi ve ne fosse quàlcuno applicabile ai casi nostri o più o meno modificabile a seconda delle circostanze.

Abbiamo quindi preso in considerazione gli apparecchi per la presa d'acqua diretta e quelli per la presa d'acqua a profondità.

a) Presa dell'acqua direttamente alla superficie: gli autori in genere consigliano di adoperare boccie d'Erlenmeyer della capacità di 100 a 200 cmc. chiuse con tappo d'ovatta, sterilizzate a secco nella stufa di Koch o di Pasteur, che si portano in sito debitamente avvolte in carta bibula sterilizzata; soltanto in alcuni casi si consiglia di sostituire ai tappi di ovatta quelli di gomma.

Noi però non ci siamo serviti di questi recipienti, sia perchè estremamente fragili, e poi perchè ogni volta il campione doveva essere portato, per l'esame, a qualche distanza dal luogo di presa, occorreva sostituire al tappo di ovatta quello di gomma, ciò che porta non poco impiccio nella sterilizzazione.

Infatti in tal caso bisogna sostituire alla sterilizzazione a secco quella ad umido, la quale si compie malagevolmente perchè con la dilatazione del gas nell'interno del recipiente i tappi facilmente scappano via dal collo della boccia.

Nemmeno è consigliabile la sterilizzazione separata dei tappi e dei recipienti, perchè nelle successive manipolazioni necessarie per adattare i primi ai secondi gli inquinamenti sono assai facili.

Prendemmo anche in considerazione i palloncini e le semplici provette col collo tirato alla lampada, ripiegato ad angolo retto, che vengono steri-

lizzate a secco e scaldate fortemente alla fiamma in maniera da rarefare più che sia possibile l'aria, chiudendone poi l'estremo alla lampada.

Questi apparecchi una volta immersi nell'acqua si aprono rompendone il collo, e avvertendo di tenerli in basso; entratavi l'acqua per il semivuoto che vi si trova si chiudono alla lampada (è sufficiente a tal uopo una comune lampada ad alcool a fiamma piccola) stirando il tubo fuso. La chiusura si facilita avendo l'avvertenza di conservare il pezzettino di collo rotto che fuso alla fiamma e riunito al collo della provetta aiuta lo stiramento e la consecutiva fusione del moncone.

Su questo principio sono fondate le comuni pipette Tursini che si portano in sito col collo ripiegato, chiuse entro provette sterilizzate più grandi e trattenutevi da un cercine di ovatta. E dello stesso tipo sono i palloni Pasteur a collo lungo, affilato, tirato alla lampada.

Questi apparecchi servono però quando il campione deve essere trasportato in luogo piuttosto lontano dal sito di presa, ed hanno sempre l'inconveniente della chiusura poco pratica.

A togliere questo inconveniente si pensò di adoperare delle pipette della capacità di 50-100-200 cmc. a tubo inferiore molto lungo; questo si porta in sito entro un tubo di saggio in cui si fissa mediante un collare d'ovatta.

Nel sito si svagina e si introduce nell'acqua perpendicolarmente, chiudendo l'estremità superiore del tubo col polpastrello del dito pollice, e tenendo tutto il tubo nel pugno della mano. Giunto alla profondità voluta si toglie il polpastrello del pollice e si lascia che l'acqua penetri dentro.

Quando si è raccolta la quantità d'acqua voluta, si estrae la pipetta e si lascia cadere l'acqua in una boccia di Erlenmeyer, sterilizzata, chiusa con tappo di gomma, e anche in una boccia a tappo smerigliato.

Fra tutti questi procedimenti nessuno ci è sembrato opportuno, specialmente per l'incomodo della chiusura alla fiamma; in ogni caso, non erano essi applicabili quando si trattava di fare un gran numero di prese in masse d'acqua continuamente mossa.

Preferimmo servirci invece di comuni boccette a tappo smerigliato che precedentemente venivano sterilizzate nella stufa di Koch, e avvolte in carta bibula sterilizzata e col collo a sua volta coperto di altra carta bibula, si portavano in sito. Quivi si toglieva l'involucro esterno di carta bibula; quindi si svolgeva l'altra carta bibula che serviva da cappuccio, senza però toglierla se non nel momento in cui la bottiglia stava per essere immersa nell'acqua.

In ogni caso, prima di fare questa operazione si dava un giro al tappo smerigliato per persuadersi del suo facile funzionamento.

Nel prelevare il campione poi si prendevano tutte le precauzioni per ovviare alla possibilità dell'inquinamento dell'acqua con germi adesi alla cute delle proprie mani, lavando quest'ultime prima nell'acqua stessa in una parte lontana dal punto di presa, poi in alcool, quindi, afferrata la boccetta, lavandone bene l'esterno nell'acqua prima di aprirla.

Di più, durante questa operazione si è sempre cercato di non far cadere nell'acqua terra od altro che potesse modificare in senso erroneo il risultato dell'esame batteriologico.

Di boccette a tappo smerigliato abbiamo continuato a servirci nella presa d'acqua diretta dalle fontane e dai rubinetti, usando tutte le precauzioni già ricordate, ad eccezione del lavaggio esterno della bottiglia che si rendeva

superfluo. Aggiungeremo soltanto che nello stappare la bottiglia, non veniva tolto il cappuccio di carta bibula per maggiore garanzia di possibili inquinamenti.

b) PRESA D'ACQUA A PROFONDITÀ, o sotto il pelo libero dell'acqua stessa non accessibile alla mano: per questo scopo abbiamo passato in rivista gli apparecchi che si utilizzano per la presa dell'acqua dei pozzi, dei laghi, dei fiumi.

Simili apparecchi sono molteplici.

Ha consigliato il Lehmann (1) di servirsi anche in questo caso di una boccia di Erlenmeyer con tappo d'ovatta coperto da un disco di piombo col sollevamento del quale si verrebbe a togliere il tappo di ovatta per mezzo di appositi fili; ma tale procedimonto è ovvio non essere affatto consigliabile, perchè è impossibile la chiusura della boccia una volta tolto il tappo di ovatta.

D'altro canto, la sottigliezza delle boccie di Erlenmeyer non permette di poterle utilizzare a grandi profondità; per questo si sono preferite le bottiglie a pareti resistenti fornite di un tappo di gomma o di vetro che viene a sollevarsi al momento opportuno per mezzo di adatta trazione, ciò che naturalmente importa uno speciale sostegno.

Su questo principio sono costruiti gli apparecchi dell'Heyroth originali modificati da Rohrbeck che sono quelli preferiti dal Metz (2). Però, questi apparecchi portando almeno due fili, uno di sostegno dell'apparecchio e uno per la trazione del tappo, non sono di maneggio così facile come si crederebbe. E d'altro canto, dovendo fare parecchie prese nello stesso sito non è facile la disinfezione dell'apparecchio di sostegno. Del resto, anche volendo passare sopra a questi inconvenienti, ne rimane sempre un altro, che è quello della difficoltà (a certe profondità addirittura insormontabile) di poter esercitare una trazione tale da estrarre il tappo dalla boccia, e ciò per la forte pressione della colonna d'acqua soprastante. Il che spiega perchè all'atto pratico questi apparecchi furono dalla generalità degli sperimentatori, sostituiti con recipienti a collo tirato alla lampada nei quali viene prima della chiusura del tubo fatto il vuoto, o con il riscaldamento alla fiamma diretta, o facendovi bollire entro dell'acqua distillata fino a completa evaporazione.

Gli apparecchi che sono più usati per tale scopo sono quelli di Miquel (3), del Roux e del Coreil (4). I recipienti usati dal Miquel e dal Roux sono dei palloni a collo assottigliato alla lampada piegato ad uncino (Miquel) o ad occhiello (Roux), contenuti da liste metalliche (Miquel) o da una calotta metallica (Roux) al cui fondo è possibile attaccare dei pesi.

Meno usato è l'apparecchio di Coreil che è molto simile all'apparecchio del Roux, soltanto il sostegno è formato da liste metalliche come nell'apparecchio di Miquel, e il recipiente usato è una comune provetta.

Tutti questi apparecchi si riempiono dell'acqua in esame alla profondità voluta, strappando il filo che tiene il tubo uncinato. Quelli di Miquel, di Roux e di Coreil si riempiono perchè in essi c'è il vuoto; altri come quello

---

(1) *Die Methoden der practischen Hygiene.* Wiesbaden, 1901.
(2) *Mikroscopische Wasseranalyse.* Berlin, 1898.
(3) Annuaire de l'Observatoire municipale de Montsouris. Paris, 1888.
(4) *L'eau potable.* Paris, 1896.

di Lepsius (1) si riempiono perchè mentre l'acqua entra dal tubo inferiore, rotto l'aria esce dal tubo superiore rivolto in alto.

Tutti questi apparecchi però li abbiamo scartati, perchè oltre avere l'inconveniente dei fili, hanno quello che si deve immediatamente saldare le aperture dei tubi alla lampada e sono quindi più adatti al prelevamento di campioni di acqua da trasportarsi a distanza che per fare delle semine in sito.

In quanto a quelli coi quali si cerca di evitare l'inconveniente dell'attorcigliamento dei fili, il più adoperato per lo scopo è il noto apparecchio delle Sclavo sia originale (2), sia modificato, e quello del Mazza (3). Noi però avremmo dato volentieri la preferenza a quello del Praum (4) che è praticissimo e molto economico. Questi adopera come recipiente di raccolta un tubo da saggio tirato alla lampada con la punta incurvata per circa 2 cm. Esso si introduce dentro un tubo di piombo al cui fondo è adattato un tappo di sughero forato e si obbliga a starvi dentro incurvando i bordi superiori del tubo di piombo. A questi bordi si attaccano delle cordicelle che si riuniscono in una sola al disopra del tubo di vetro.

Calato l'apparecchio alla profondità voluta, si lascia scivolare lungo la corda un peso di piombo, il quale cadendo sul collo affilato della provetta lo rompe. Però esso, come gli altri, per quanto molto pratici, ha delle parti molto delicate, deve essere chiuso alla lampada appena estratto, e bisogna romperlo per procedere alle semine.

Abbiamo anche scartato l'apparecchio usato dal Frisoni (5) per lo studio dell'acqua dei laghi, che avremmo adottato ove non avesse avuto l'inconveniente di esser fornito di due corde e quello della difficile chiusura.

Pensammo quindi di ricorrere a procedimenti più alla mano.

Usammo da prima i palloncini di Miquel col collo a cappuccetto smerigliato tirato alla lampada, chiusi in apposito astuccio metallico, a cui venivano attaccati dei pesi di piombo.

Alla profondità voluta si dava uno strappo al filo attaccato all'estremo del tubo con la rottura del quale si permetteva l'entrata dell'acqua entro il recipiente essendovi stato fatto precedentemente il vuoto. Benchè però con questo procedimento si evitasse l'incommodo del dover rompere il recipiente all'atto della semina, tuttavia abbandonammo l'uso del medesimo per la difficoltà di mantenervi il vuoto e preferimmo di modificarlo altrimenti.

A tal uopo ci servimmo di palloncini di Miquel a bocca smerigliata stretta al cui cappuccetto saldammo lateralmente un piccolo tubo di vetro. Entro al palloncino introducemmo una pallina di vetro a cui veniva impedita l'uscita stringendo il collo del pallone alla fiamma.

Per mettere in funzione l'apparecchio s'innesta al tubo laterale un tubo di gomma; si chiude il tubetto verticale con tappo di ovatta fornito di un filo, e si introduce l'apparecchio in un cilindro metallico provvisto di pesi; quindi lo si cala alla voluta profondità e si tira il filo che trattiene il tappo di ovatta: l'acqua entra allora per il tubo rimasto pervio mentre l'aria esce

---

(1) V. Metz, loc. cit., pag. 341.
(2) Rivista d'Igiene e Sanità pubblica. Anno 1899, pag. 596.
(3) Rivista d'Igiene e Sanità pubblica. Anno 1899, pag. 529.
(4) Central. f. Bakt. I Abt., Bd. XXIX, pag. 994, 1901.
(5) Questi Annali d'Igiene Sper. Anno 1900, pag. 229.

per il tubo di gomma. Man mano che entra l'acqua la pallina di vetro viene sollevata finchè in corrispondenza del collo della bottiglia chiude l'accesso a nuova acqua. Essendo il cappuccetto divisibile dal collo della bottiglia si procede alla prelevazione dell'acqua per le semine senza dover rompere l'apparecchio.

Successivamente uno di noi (Casagrandi), in special modo occupandosi di questa parte della tecnica, fece costruire un apparecchio per la presa d'acqua a profondità (1) che ci è servito in tutti i successivi esami sistematici.

Esso consta (figg. 14, 15) di una bottiglia di vetro sterilizzabile con una strozzatura (*a*) in corrispondenza del collo; entro la bottiglia prima di procedere alla strozzatura si introduce una pallina di vetro (*b*), il cui diametro deve essere superiore a quello del punto strozzato dalla bottiglia.

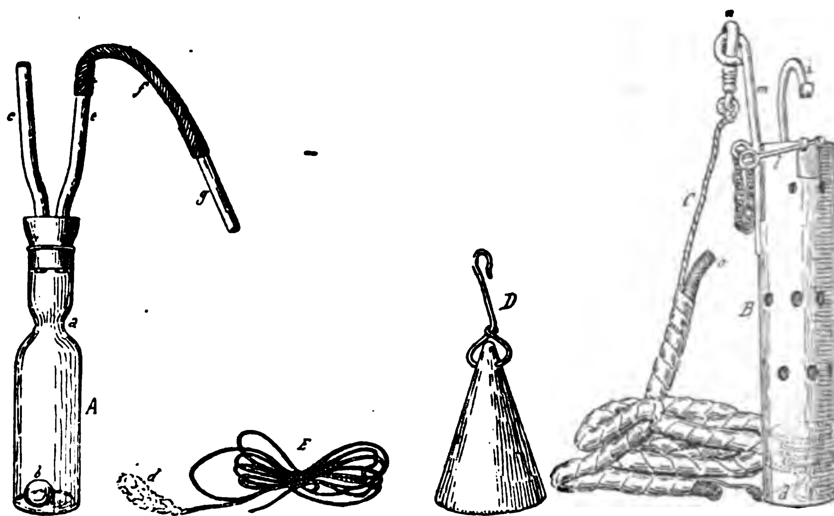


Fig. 14.

Il collo è cilindrico e vi si adatta un tappo di gomma a doppio foro, in ognuno dei fori si introduce un tubo di vetro leggermente curvo all'infuori. In uno di questi tubi (*c*) si introduce un tampone di ovatta non idrofila, legato ad un filo, il quale tampone dove occupare tutta la lunghezza del tubo: nell'altro tubo (*e*) si adatta un tubicino di gomma (*f*) al quale si innesta un tubetto di vetro (*g*) che si chiude con un piccolo tappo di ovatta.

Le parti dell'apparecchio si sterilizzano una prima volta separatamente, cioè le bottigliette nella stufa a secco, il tappo e gli annessi nella pentola di Koch, poi adattati questi ultimi alla boccetta si sterilizza una seconda volta tutto l'apparecchio nella pentola di Koch.

---

(1) Rassegna internazionale di medicina moderna. Anno III, 1902, pagine n. 7-8.

Per prelevare il campione la boccetta così preparata si introduce entro un cilindro metallico (*B*) a pareti robuste, entro al quale evvi un fondo molto alto di piombo che fa da peso, al quale se ne può attaccare un altro (*D*) essendo provvisto di un occhiello (*a*).

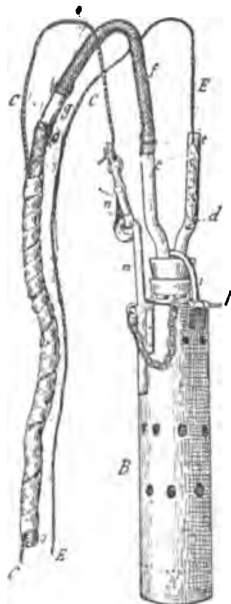


Fig. 15.

La boccetta poggia sopra un disco a molla contro cui si spinge per mezzo di un semicerchio (*i*) metallico, da un lato mobile a cerniera, e dall'altro fissabile a mezzo di un punteruolo che scorre in un'adatta guaina.

Questo semicerchio si fa passare fra i due tubi del tappo, ed una volta a posto immobilizza la boccetta impedendo nello stesso tempo che il tappo possa distaccarsi.

Alla parete del recipiente è attaccato poi un grosso asse (*m*) di metallo foggiato ad occhiello che si eleva sull'orlo del cilindro per 5 e 6 cm. A questo occhiello si attacca la corda di sostegno (*C*) per mezzo di un moschettone a molla (*n*).

Alla corda è annesso, per mezzo di una fettuccia ravvoltolata ad elica, un tubo di gomma (*o*) il quale in sito si innesta al tubicino di vetro (*g*) che è attaccato al tubo di gomma di uno dei tubi di vetro del tappo (levando si intende il tamponcino di ovatta che vi si era posto in laboratorio).

Al momento di prelevare il campione si attacca un'altra cordicella (*E*), per mezzo di un secondo moschettone a molla, al filo che è legato al tampone di ovatta introdotto entro l'altro tubo di vetro del tappo.

Si cala quindi l'apparecchio nell'acqua tenendo con la mano destra la corda (*C*) a cui è annesso il tubo di gomma, e con la sinistra la cordicella (*E*) che è attaccata al tappo di ovatta, cercando di far gravitare tutto il peso sulla prima (*C*) poichè è quella che sostiene l'apparecchio.

Raggiunta la profondità voluta, che non deve mai esser superiore alla lunghezza del tubo di gomma, si dànno degli strappi più o meno violenti all'altra cordicella (*E*); il tappo d'ovatta (*d*) viene così strappato e l'acqua entra dal tubo di vetro (*C*) rimasto pervio; mentre l'aria esce dall'orifizio superiore del tubo di gomma.

La bottiglia si riempe molto rapidamente: ad ogni modo conviene tenerla immersa, specialmente se l'acqua è corrente, almeno mezzo minuto. La pallina di vetro (*b*) man mano che si riempie la bottiglia si solleva e si adatta alla strozzatura del collo (*a*) della bottiglia stessa.

Al disopra della medesima continua ad entrare acqua e quando si tira fuori l'apparecchio si trova pieno anche il tubo di vetro (*c*).

Per fare gli innesti si toglie il tappo con gli annessi e nel fare questa operazione con una leggera scossa alla boccia si butta via l'acqua contenuta nel collo, al disopra della pallina, per evitare il presunto inconveniente che nell'estrarre la boccia abbia potuto entrare qualche poco d'acqua superficiale, fatto che del resto non può succedere, poichè caso mai man mano che l'apparecchio raggiunge la superficie dell'acqua, quella che si contiene nella boccia tenterà uscire e impedirà che della nuova e più superficiale ne entri.

Dovendo prelevare diversi campioni si possono portare in sito varie bocce montate e sterilizzate, e l'apparecchio di sostegno prima d'essere adoperato si può immergere in un cilindro del pari metallico, ripieno di alcool, che ne costituisce l'astuccio.

Va da sè che a seconda della lunghezza del tubo di gomma l'apparecchio si può immergere a diverse profondità; generalmente però non è consigliabile di superare i 5-10 metri dal pelo dell'acqua.

L'operatore può talora trovarsi ad una altezza molto più considerevole qualora usufruisca di una corda molto lunga; in questo caso occorre, nel calare il recipiente, tenere lontano più che sia possibile dalla corda di sostegno (*C*) la cordicella (*E*) annessa al tampone di ovatta, per togliere l'inconveniente dell'attorcigliarsi di quest'ultima intorno alla corda stessa.

Questo inconveniente non si verifica del resto che calando l'apparecchio da un'altezza superiore ai 5-10 m. Ad altezze inferiori se l'attorcigliamento avviene, con un po' di pazienza si riesce sempre a colpire il momento in cui la cordicella si srotola e con uno strappo violento il tappo di ovatta viene tolto. Certo l'apparecchio non può servire per prelevare i campioni a grandissima profondità.

L'apparecchio ora descritto ha il vantaggio sugli altri di non doversi rompere per farvi entrare l'acqua, e per estrarla, di non dover fare il vuoto, e chiuderne l'orifizio alla lampada, cosicchè quindi può servire molte volte.

I campioni prelevati possono anche non seminarsi in sito e portarsi in laboratorio sostituendo al tappo e ai suoi annessi un altro tappo di gomma che si porta sterilizzato seco per lo scopo.

Del resto modificando opportunamente il collo della bottiglia si potrebbe anche procedere ad una chiusura alla lampada sul sito stesso, ma questa operazione è perfettamente superflua.

Per la *presa d'acqua nei punti in cui la corrente è molto forte*, la pratica ci dimostrò che nessuno degli apparecchi sopra enumerati si prestava bene

a meno che non si attaccassero ad esso dei pesi molto grandi i quali finivano col riuscire di danno al sostegno dell'apparecchio.

Provammo ad ogni modo quelli che ci sembravano più adatti per le prese a grandi profondità.

Ci parve dapprima di poter servirci di uno di Celli (1) costituito da una vaschetta metallica conica, verniciata, contenente del mercurio che è di per sè sterile, nel quale si fa pescare il collo di una fiaschetta sterilizzata in cui si è fatto col riscaldamento il vuoto, e che non può risalire perchè un apposito anello a vite ve la tiene fissata. La vaschetta è mantenuta sospesa da due funicelle in mezzo alle quali ne esiste una terza che si fissa al sostegno della fiaschetta, e che mediante un movimento di saliscendi si può alzare ed abbassare. L'apparecchio si cala con il collo della fiaschetta immerso nel mercurio, e giunto alla profondità voluta si tira la funicella di mezzo, in modo che il collo della fiaschetta non peschi più nel mercurio: così l'acqua entra. Allora si lascia la funicella, così la fiaschetta s'immerge nuovamente nel mercurio e si ritira l'apparecchio.

Di questo apparecchio però non potemmo fare uso conveniente attesa la rapidità della corrente e lo spessore relativamente piccolo della falda acquea per cui non si poteva immergere completamente.

Tentammo ancora di usare un altro apparecchio per la presa a grandi profondità descritto da Casagrandi, e che (2) fornito di una sola corda e di un forte peso di sostegno consta di due pezzi, il recipiente per la raccolta del liquido, e quello di sostegno.

All'atto pratico, dovemmo però scartare anche questo apparecchio perchè trovandoci quasi sempre nel caso di falde liquide fornite di poco spessore riusciva estremamente difficile di far calare il peso apritore lungo la corda tenendo quest'ultima verticale, e quindi bisognava dare degli strappi alla corda stessa di modo che l'apparecchio veniva spesso ad emergere dal pelo dell'acqua nel momento in cui il peso cadeva sul braccio morto della leva e la sollevava aprendo la bottiglia.

Ricorremmo quindi anche in questi casi all'uso dell'apparecchio già ricordato a pag. 750 il quale offrì vantaggi superiori a tutti gli altri evitando gli inconvenienti finora lamentati.

c) PRESA DELLE MATERIE DEL FONDO. — Per questo scopo non abbiamo potuto servirci di apparecchi già noti perchè con essi non riuscivamo a prelevare il deposito formatosi al fondo delle sorgenti, degli acquedotti e dei serbatoi.

Abbiamo quindi dovuto ideare un apparecchio che servisse allo scopo.

Ci servimmo di un pezzo di piombo (fig. 16) cilindrico del peso di circa 2 kg. nel cui asse abbiamo fatto passare un cannello di ottone del diametro di una comune provetta. Lateralmente presso a poco all'estremo del diametro equatoriale del cilindro si trovano due occhielli orizzontali attraverso i quali passano due asticelle metalliche fornite di una capocchia per non sfuggire dai medesimi; queste assicelle metalliche costituiscono il sostegno di una piastra anch'essa metallica che si bilancia al di sotto della superficie infe-

(1) Questi Annali d'Ig. Sperim. Anno 1900, pag. 237.
(2) Rassegna Inter. di medicina moderna. Anno III, 1902, n. 7, 8.

riore del cilindro. La piastra può girare attorno all'asse trasverso del cilindro poichè gli anelli bilaterali sono mobili attorno al proprio asse.

Essa possiede poi una fenditura lunga quanto uno dei suoi raggi e larga circa mezzo centimetro.



Figura 16.

Alla superficie superiore del cilindro è adattata una calotta a cerniera. Alla periferia della superficie superiore del cilindro stesso trovansi due occhielli ad ognuno dei quali è legata una cordicella che poi si riunisce in una sola che serve di sostegno all'apparecchio.

I recipienti per prelevare l'acqua sono rappresentati da comuni provette di vetro in cui si fa il vuoto riscaldandole fortemente alla fiamma e incurvandone ad angolo retto l'estremo che si fonde alla lampada.

Queste provette si portano in sito avvolte in carta bibula sterilizzata e si introducono nell'asse del cilindro dalla parte inferiore spostando lateralmente la piastra metallica indi si mette a posto quest'ultima badando che nella fessura che vi si trova si infili il collo della provetta in maniera che la parte orizzontale dello stesso sporga al di fuori della piastra.

Al momento di servirsene si lascia andare l'apparecchio con una certa rapidità fino a che tocchi il fondo. Allora la piastra metallica con l'urto si avvicina rapidamente alla superficie inferiore del cilindro di piombo mentre l'estremo della provetta colpisce il fondo e si spezza. In tal guisa, per il

vuoto esistente nella provetta, il materale limaccioso o sabbioso penetra nell'interno della provetta stessa.

Questa poi non può uscire dalla parte inferiore del cilindro perchè trattenuta dal coperchio a calotta.

Estratto l'apparecchio lo si capovolge con movimento rapido, si apre la calotta metallica e si sposta lateralmente la piastra; allora la provetta scivola dall'astuccio ed è facile estrarla afferrandola per i suoi tre quarti inferiori e introdurla poi in un tubo da saggio sterilizzato chiuso con tappo di ovatta se l'esame si deve fare subito: in caso diverso si chiude alla lampada.

Naturalmente l'apparecchio di sostegno deve essere immerso nell'alcool prima di essere adoperato, il che evita di doverlo sterilizzare nella stufa di Koch volta per volta.

In tutti i modi la provetta si apre o con un colpo di lima passata attraverso alla fiamma, o col carbone di Berzelius, oppure più semplicemente scaldandone la parte superiore alla fiamma e poi facendo pervenire con rapido movimento l'acqua interna a contatto del vetro riscaldato.

2. Tecnica della semina. — Una volta prelevata l'acqua per mezzo degli apparecchi sopra ricordati, i campioni venivano portati nella casa del custode dove avevamo impiantato un laboratorio perfettamente fornito di tutto per le eventuali ricerche inerenti all'esame da compiere. Indi apertili con le le dovute cautele per mezzo di pipette sterilizzate della capacità di 1 cmc. si prelevavano da ciascun campione due centimetri cubici di acqua che si distribuivano in capsule di Petri o in fiaschette piatte di cui possedevamo i modelli di Petri e di Rozsahegyi.

Soltanto queste ultime contenevano già il sustrato di nutrizione sciolto a bagno-maria, mentre le capsule del Petri erano vuote ed in esse veniva in secondo tempo aggiunto il sustrato di nutrizione.

Preferimmo seguire questa tecnica e non l'altra di innestare il centimetro cubo di acqua nei tubi contenenti il materiale nutritivo sciolto e poi versare il miscuglio nelle capsule per evitare che dei germi rimanessero nei tubi da saggio svuotati.

Solo in qualche caso, volendo fare un gran numero di semine, ci siamo serviti di grossi tubi da saggio sul modello di quelli di Würtz per l'esame batteriologico dell'aria ma sforniti di tubulatura laterale: con essi praticavamo delle colture rotolate.

In molti casi e specialmente quando abbiamo fatte le semine dei campioni presi durante il sollevamento e l'abbassamento di livello ci siamo serviti delle capsule Petri di grande modello nelle quali abbiamo fatto pervenire il solito cmc. di acqua sempre prima di versarvi il sustrato di nutrizione.

Per la semina poi del materiale raccolto dagli stillicidi, dalle pareti, dal fondo delle sorgenti e dagli acquedotti ci siamo serviti di pipette graduate al decimo di cmc. ed abbiamo innestato nelle capsule un decimo di cmc. di acqua tenente in sospensione le particelle del materiale raccolto.

Per farci poi un concetto delle quantità di sostanze solide seminate, ogni campione veniva, nell'Istituto d'igiene di Roma, centrifugato in tubetto graduato per poterne dedurre volumetricamente e ponderalmente la quantità del deposito per ogni centimetro cubo: raccolto il deposito veniva seccato e pesato per stabilirne il per cento in peso nell'acqua stessa.

In ogni caso, sia che si facesse l'innesto nelle capsule del Petri, sia nelle

fiaschette piatte, quando si usava come sustrato di nutrizione l'agar, i recipienti venivano rovesciati per evitare che l'acqua di condensazione rimanendo sui sustrati di nutrizione impedisse alle colonie di svilupparsi separatamente formando delle patine che rendessero impossibile la conta.

Quando poi si adoperava la gelatina, si aveva cura di porli in ambiente a temperatura uniforme per impedire ch'evaporasse dal sustrato il vapore acqueo, il quale condensandosi sul coperchio vi poteva sgocciolare sopra.

3. Terreni nutritivi. — Prima di accingerci all'esame dell'acqua Marcia abbiamo scelto i terreni di nutrizione anche perchè i nostri dati si potessero confrontare con quelli di altri autori. In questi ultimi tempi, infatti, attese le disparità dei risultati che si ricavano dai vari esami batteriologici delle acque, alcuni tentarono servirsi di terreni nutritivi la cui composizione fosse identica e costante.

L'Hesse e il Nieder (1) proposero un terreno agarizzato, contenente albumosa, secondo la formula seguente:

Agar.	1.25 %
Albumosa Heyden.	0.75 %
Acqua distillata.	98.00 %

L'Abba (2) invece propose una soluzione di estratto di carne Liebig gelatinizzato giusta la formula seguente:

Brodo concentrato di Liebig . . . . gm.	6
Gelatina . . . . »	150
Acqua distillata . . . . »	1000

Il Simonetta (3) propose poi una gelatina alla sarcolina.

A parte la proposta di quest'ultimo autore che non ha ancora ricevuto sufficienti controlli, quella dell'Hesse e Nieder e quella dell'Abba meritavano di essere da noi prese in considerazione perchè sufficientemente entrate nella pratica.

Abbiamo quindi adoperato l'agar dell'Hesse e del Nieder in confronto con l'agar-agar al brodo di Löffler preparato secondo i comuni metodi di tecnica e debitamente alcalinizzato e ci siamo potuti convincere che *le colonie dei batteri che si sviluppano nel primo non sono di numero superiore a quelle che si sviluppano nel secondo terreno.* Inoltre in quello avviene piuttosto tardivamente lo sviluppo dei germi; le colonie compaiono a poco a poco, per cui è necessario aspettare non meno di 15 giorni per avere la quasi certezza di poter procedere alla conta senza che ognuna di esse debba ancora aumentare.

Basti, per convincersene, osservare il quadro seguente in cui è indicato il numero delle colonie dei germi sviluppatesi dopo 15 giorni di dimora a 30° delle piastre di agar Hesse e di agar ordinario, seminate con 1 cmc. di acqua proveniente dallo stesso campione.

---

(1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXIX, pag. 454, 1898.
(2) Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1900, pag. 343.
(3) Siena. Tip. Editrice S. Bernardino, 1899.

TABELLA *B*.

Numero delle semine	Numero delle colonie sviluppatesi in agar Hesse e Nieder	in agar ordinario
1	281	321
2	12	36
3	48	59
4	73	61
5	45	40
6	8	28
7	31	7
8	478	321
9	872	940
10	12	10

Certamente qualche volta si hanno risultati diversi, ma solo per eccezione. Del resto la tabella 16 (vedi pag. 828) ci dice che il numero dei germi che si può contenere nello stesso campione può variare da cmc. a cmc., per cui qualche piastra può presentare un numero di colonie maggiore di un'altra, pure essendo fatta la semina nello stesso terreno. Ma ciò non toglie che in massima valga quanto abbiamo detto.

Tali nostre conclusioni del resto sono le stesse cùi giunse Walbaum (1).

In quanto alla gelatina proposta dall'Abba abbiamo ripetuto i medesimi confronti con la gelatina al brodo di Löffler sempre debitamente alcalinizzata, e siamo venuti alla conclusione che essa non ha alcun vantaggio su quest'ultima; certo però non è indifferente il grado di alcalinità del sustrato nutritivo e conveniamo perfettamente con l'Abba sulla necessità di seguire un procedimento uniforme. E poichè ci siamo potuti convincere che, seguendo il procedimento indicato dall'Abba, la gelatina contenente il $^1/_2$ per 1000 di carbonato sodico è quella nella quale si sviluppano maggior numero di germi nel tempo più breve, cercammo di mantenere sempre questo grado di alcalinizzazione.

Non abbiamo tentato di risolvere la questione se i sustrati agarizzati fossero migliori di quelli gelatinizzati preferendo di seminare ciascun campione di acqua e in gelatina e in agar. Così mentre da un lato con la semina in gelatina venivamo a distinguere nella conta le colonie fluidificanti dalle non fluidificanti e ad evitare quello sviluppo di una patina sulla superficie del sustrato di nutrizione che si ha tanto spesso sull'agar, nelle semine in quest'ultimo venivamo a differenziar meglio i cromogeni dai non cromogeni, e potevamo nello stesso tempo ritardare la conta per settimane senza pericolo di trovare il terreno dall'oggi al domani fluidificato.

In alcuni casi, quando cioè i campioni ci risultavano sterili, praticammo anche semine in brodo col metodo di diffusione consigliato dal Beyerinck. Ma non a lungo adoperammo questo metodo per la difficoltà di dover conoscere *a priori* la sterilità dell'acqua e per la impossibilità di poter con

(1) Centralb. f. Bakt. I. Abth., 1901, Bd. XXX.

essa procedere a delle conte. Di queste ricerche quindi non teniamo conto nei risultati che saremo per esporre.

Ci siamo anche serviti della gelatina agarizzata del Bordoni-Uffreduzzi (1), ma vedemmo che non ha alcun vantaggio sulla gelatina e sull'agar, mentre ha tutti gli inconvenienti di quest'ultima.

I terreni innestati venivano da noi posti a svilupparc in adatti ambienti, a temperatura uniforme intorno ai 20° C; soltanto in alcuni casi, specie quando si innestavano campioni d'acqua già più volte studiata, le semine in agar venivano poste in termostato per le prime 24 ore e poi successivamente lasciate a temperatura ordinaria.

Non abbiamo creduto di dover dare un maggior peso alla *temperatura* perchè dai raffronti fatti fra il numero delle colonie sviluppatesi a temperatura ambiente e quelle alla temperatura del termostato non ci è sembrato di scoprire differenza.

Invece abbiamo dato maggior peso al *periodo d'incubazione* contando non prima di 15 giorni le colonie sviluppatesi nell'agar, e molte volte anche più tardi, mentre la conta delle colonie in gelatina l'abbiamo fatta più tardivamente che fosse possibile. Non abbiamo creduto però di seguire il metodo indicato dall'Abba, di aggiungere cioè un certo numero di colonie a quelle trovate in gelatina dove la conta veniva fatta prima del quindicesimo giorno, perchè avendo contemporaneamente fatte le semine in agar avevamo dei dati sicuri per decidere del numero delle colonie sviluppantesi dal centimetro cubo di acqua seminata.

Del resto ove si fosse applicato questo metodo non poche volte saremmo incorsi in errore poichè certi campioni di acqua contenente scarsissimi germi avremmo ritenuti contenerne di più e quindi non saremmo affatto rimasti nel vero.

4. Ricerca di germi patogeni. — In questa ricerca abbiamo dirette le nostre indagini al bacillo del tifo, al bacillo del colon ed ai vibrioni. Per vedere se questi germi si trovassero nell'acqua facemmo una serie di semine saltuariamente nei diversi periodi in cui è durato l'esame prelevando i campioni alle sorgenti, all'acquedotto, al serbatoio di Quintiliolo e a Roma, seguendo i procedimenti migliori in precedenza controllati nell'Istituto e giudicati più adatti, evitando costantemente di servirci di quelli che o non ci sembravano utili allo scopo o non sono entrati sufficientemente nella pratica.

Ricerca del b. del tifo. — Per ricercare il b. del tifo nelle acque i metodi che furono consigliati sono innumerevoli, ciò che sta a dimostrare come nessuno di essi possa ritenersi il più idoneo.

Nel nostro Istituto furono da tempo controllati e discussi.

Anzitutto furono presi in considerazione i brodi fenicati, acidificati, fenicati ed acidificati insieme; e il Capogrossi (2) riguardo ai brodi fenico-

---

(1) *I microparassiti.* Vallardi, Milano.
(2) Questi Ann. d'Ig. Sperim., 1900, pag. 222.

cloridrici Parietti (1) trovò che non sono specifici del b. del tifo nè rappresentano il metodo migliore per la ricerca di questi germi.

È certo poi che nessun altro sustrato nutritivo liquido si può ritenere abbia finora superato quello introdotto dal Parietti. Lo stesso brodo del Remy (2), che fu vantato come il migliore di tutti, non offre vantaggi superiori al precedente, non fosse altro che per la sua difficile manipolazione.

Volendo però adoperare i brodi Parietti per l'innesto dell'acqua è utile escludere quelli della prima serie che per l'acidità troppo debole permettono lo sviluppo di altri germi.

Accanto ai terreni liquidi fu proposta una serie di terreni solidi gelatinizzati ed agarizzati, e, a parte quelli che non furono sottoposti a sufficienti controlli, è la gelatina di Elsner (3) il terreno nutritivo che per lo passato fu più in uso e la gelatina di Piorkowsky (4) quello che attualmente più si adopera insieme col recente terreno agarizzato di Drigalski e Conradi (5). Però anche questi sustrati in massima non si possono ritenere assolutamente specifici per la ricerca del b. di Eberth.

Difatti nella gelatina di Elsner fu dimostrato che molti similtifi si sviluppano formando colonie sottili, esili, a lievi nervature che ricordano perfettamente quella tipica del tifo, e che il b. coli si sviluppa spesse volte molto bene anche in primo tempo ossia con la stessa rapidità di sviluppo che alcune volte dà il tifo.

In quanto al terreno di Piorkowsky il Ciaccio (6) ha trovato che si presta allo sviluppo del coli e dei similcoli come allo sviluppo del tifo e dei similtifi: i caratteri delle rispettive colonie non valgono a differenziare il b. di Eberth dal b. coli nei casi (è vero, eccezionali), in cui il b. coli non presenta colonie con filamenti.

Quanto al terreno del Drigalski e Conradi il Tusini (7) ha dimostrato che realmente in esso il b. del tifo si sviluppa senza arrossare il terreno di nutrizione, ma questo soltanto fino a che non sia accompagnato dal b. coli; inoltre analogamente a quest'ultimo si riportano i bacilli dissenterici che si possano trovare nell'acqua.

Mancando la specificità assoluta dei terreni di nutrizione per la ricerca dei b. di Eberth nelle acque ci siamo serviti di un procedimento che venne adottato tempo fa da uno di noi e che abbiamo soltanto di recente modificato, dopo che lo controllammo del metodo Drigalski-Conradi. A tal uopo venivano seminati 10 tubi di brodo Parietti della seconda serie aggiungendo quantità crescenti di acqua da 1 decimo di cmc. ad 1 cmc. Dopo 24 ore di permanenza di questi tubi nel termostato alla temperatura di 37-41 C si sceglievano quelli uniformemente intorbidati senza forte deposito e senza pellicola in superficie e si facevano passaggi nel terreno del Piorkowsky. Dopo tre giorni si esaminavano al microscopio le colonie sviluppatesi in questa gelatina e se non si trovavano colonie a filamenti si continuava nelle ricerche.

---

(1) Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1890, n. 11, pag. 409.
(2) Ann. dell'Ist. Pasteur, 1900.
(3) Zeitsch. f. Hyg., Bd. XXI, 1896.
(4) Berl. Med. Gesellschaft, 1899.
(5) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIX, 1902.
(6) Questi Ann. d'Igiene Sperim., fasc. II, 1900.
(7) Questi Ann. d'Ig. Sperim. Fascicolo I, 1903.

Si sceglievano perciò le colonie più sottili e a bordi meno regolari; si isolavano facendo colture in brodo o in agar a strisciamento e da queste si facevano poi dei passaggi in gelatina lattosata e in latte per vedere se il germe produceva gas o coagulava il latte.

Recentemente poi abbiamo sostituito alle piastre in gelatina lattosata quelle in agar di Drigalski-Conradi, e gli innesti in agar di Rothberger (1) nel quale ultimo terreno soltanto il b. del tifo (tra i coli e i similtifi) si sviluppa senza dare fluorescenza.

Ricerca dei b. coli. — Questa ricerca nelle acque è abbastanza facile. In genere si è veduto che tutti i terreni, i quali servono per la ricerca del b. di Eberth, servono anche per quella del b. coli.

Però fra tutti i metodi ha preso il sopravvento quello dell'Abba il quale adopera il brodo lattefenolftaleinizzato (2) di cui se ne prendono 100 cmc. ai quali si aggiungono 900 cmc. dell'acqua in esame, un po' di fenolftaleina in soluzione all'1 per cento e tanto carbonato sodico in soluzione acquosa satura quanto è necessario per dare alla massa liquida una tinta decisamente rosea.

Noi ci siamo serviti costantemente di questo metodo, però siccome non sempre potevamo usufruire di quantità così rilevanti di acqua abbiamo usato quantità inferiori del brodo di Abba che abbiamo per comodità di trasporto, quando gli esami si facevano lontano dal laboratorio, usato anche solidificato con gelatina. Il terreno innestato veniva posto in termostato, dopo 12 ore se ne prelevava una certa quantità con un batuffolo di ovatta sterile e senz'altro si seminava da un lato in gelatina Piorkowsky, dall'altro in gelatina al lattosio e al tornasole. Dopo 3 giorni dell'avvenuto innesto si sceglievano le colonie che più potevano ricordare quelle del b. coli e si sottomettevano ad un accurato studio morfologico e biologico, servendoci anche della prova in agar Drigalski dove lo sviluppo del b. coli è assai caratteristico e in quello di Rothberger, nonchè della sierodiagnosi.

Ricerca dei vibrioni. — Per questa ormai tutti gli autori sono d'accordo nel seguire il metodo del Dunhan-Koch (3) ossia aggiungendo al campione d'acqua un po' di sale e di peptone (grammi 0. 5 per cento di cloruro sodico e grammi 1 per cento di peptone) ed esaminando la pellicola che eventualmente si produce sul liquido dopo 7-12 ore di dimora in termostato a 37 C e facendo quindi seguire tutti i procedimenti per la diagnosi batteriologica del colera.

---

(1) Centr. f. Bakt. I Abt. 1898, p. 513.
(2) Central. f. Bakt., Bd. XIX, 1896.
(3) Zeitschr. f. Hyg., Bd. II, 1887.

IV. — Analisi batteriologiche quantitative.

1. Batteriologia dell'acqua Marcia alla scaturigine delle sorgenti.

Primi saggi di analisi batteriologica. — Era già nota la invidiabile purezza batteriologica di quest'acqua alle sue scaturigini. Per esempio, uno di noi (1) nel marzo 1885 avea trovato da 0 a 6 batteri per cmc.; Sanfelice e Orefice (2) nel febbraio 1892 non ve ne trovarono affatto.

Coi metodi più perfezionati (vedi pag. 755 e seg.) e con tutte le cautele che l'esperienza di questi ultimi anni insegnò abbiamo voluto rifare nuovi saggi batteriologici preliminari avanti di procedere a ricerche sistematiche.

Tabella *C.*

Luogo di presa del campione	19 novembre 1899 — Numero totale dei batteri per centm. cubo	19 dicembre 1899 — Numero totale dei batteri per centm. cubo
1ª Serena	2	3
2ª Serena	0	1
3ª Serena	0	3
4ª Serena	2	0
Galleria Santa Lucia	3	10
Pozzo Santa Lucia	8	6

E come dimostra la tabella precedente, *tutte le sorgive dell'acqua Marcia si mostrarono ancora una volta batteriologicamente purissime.*

Dopo ciò abbiamo voluto sottoporre l'acqua Marcia ad

Analisi batteriologiche sistematiche. — Queste furono ripetute nelle stagioni *quando era più possibile un mutamento delle sorgenti per una qualsiasi infiltrazione dall'esterno,* cioè:

---

(1) Celli, loc. cit.
(2) Loc. cit.

A) *Durante le pioggie estive (acquazzoni) in montagna, sul bacino imbrifero.*

1° periodo d'osservazioni: 23 agosto-5 settembre 1901. — Già Santori (1) suppose che a pioggie eccezionali potesse talvolta tener dietro un aumento anche eccezionale dei batteri in tutte le 4 acque condotte in Roma. In sostegno però di questa ipotesi non portò che un unico fatto, cioè la coincidenza di un contemporaneo aumento straordinario di batteri in tutte le 4 acque condotte avvenuto una volta. Contro questo solo ed inesplicabile caso sta, possiamo dire, la regola, per cui fra pioggia e aumento di batteri nell'acqua non si ebbe mai alcun rapporto. Ad ogni modo per risolvere così importante questione abbiamo scelto 3 delle sorgenti, una per ogni tipo di allacciamento (vedi pag. 738 e seg.), cioè:

1ª Serena (raccolta dell'acqua mediante drenaggi, senza bacino di mostra: semplice edificio di unione dei drenaggi, onde parte l'acquedotto nuovo).

2ª Serena (drenaggio come sopra e bacino di mostra da cui partiva l'acquedotto vecchio).

Galleria di Santa Lucia, scavata nella viva roccia per una lunghezza di metri 24.

Abbiamo raccolto l'acqua in diverse condizioni come risulta dalle seguenti avvertenze ed abbreviazioni, per la chiara intelligenza delle tabelle.

Il numero dei batteri si riferisce sempre a 1 cm. cubo di acqua campione seminata.

Le colonie a sciame o a zooglee dello stesso batterio sono considerate = 1.
Centro *S.* — Campione preso alla superficie del centro della corrente.
Centro *P.* — Campione preso alla profondità del centro della corrente.
Centro *F.* — Campione preso al fondo del centro della corrente.
Parete *S.* — Campione preso alla superficie della corrente lungo la parete.
Parete *P.* — Campione preso alla profondità della corrente lungo la parete.
Parete *F.* — Campione preso nel fondo della corrente lungo la parete.
Tra *C* e *P.* — Campione preso tra il centro e la parete.
S superficialmente, *P* profondamente, *F* al fondo.
Pt. — Patina (che nel calcolo dei batteri viene considerata = 1).
Fl. — Fluidificazione.

Abbiamo inoltre analizzato batteriologicamente la raschiatura, le sgocciolature, le pellicole delle pareti e, dove ce n'era, la sabbia del fondo delle opere di presa delle sorgenti.

---

(1) Loc. cit. *Perizie e ricerche del 1896.*

Dalle tabelle 1, 2 e 3 (vedi pag. 813-816) risulta come *per 14 giorni di seguito analizzata batteriologicamente l'acqua delle principali sorgenti si mantiene sempre pura, senza dunque risentire gli effetti delle pioggie torrenziali che cadono nel bacino imbrifero.*

La media dei batteri oscilla da 13 a 18 per cmc. Si viene così ad escludere ogni timore che attraverso ai sopradetti divoracci, o a spaccature o caverne sotterranee, le acque superficiali dei fiumi o torrenti del bacino imbrifero abbiano rapida e diretta comunicazione con le scaturigini.

Si vede pure come, anche essendo sempre basso il numero dei batteri, è però minore e non subisce grandi oscillazioni dove le opere di presa sono più perfezionate (1ª Serena); e qui anche le raschiature delle pareti e della volta o l'acqua del fondo sono assai povere di batteri: mentre invece la sorgente captata coi vecchi sistemi (2ª Serena) è più ricca di germi e di quelli fluidificanti in ispecie, oltrechè va talvolta soggetta ad aumenti che salgono dai 2 ai 5 mila batteri.

B) *Durante le piogge autunnali e le inondazioni dell'Aniene.*

2° periodo di osservazioni: 19-22 dicembre 1901. — Si è sospettato più volte, e da alcuni si ritiene ancora possibile un intorbidamento delle sorgenti dell'acqua Marcia, dovuto alle piene ed alluvioni dell'Aniene; e per quanto le opere di difesa (vedi pag. 745) siano oggimai tali da escludere ogni sospetto, pure noi volemmo batteriologicamente accertarcene, nello stesso tempo che potevamo così controllare la batteriologia della volta, delle pareti, del fondo, delle opere di presa delle varie acque sorgive.

Scegliemmo il tempo in cui gran parte della valle, al piano delle scaturigini e proprio vicino a queste era inondata; e, dovendo essere più immediato, se mai può venire, questo rimescolamento dell'acqua fluviale con quella sorgiva, limitammo a 4 giorni il periodo di raccolta dei campioni: in compenso estendemmo l'esame a tutte le scaturigini, nel dubbio che una sola e non le altre fossero soggette a un simile inquinamento.

Le tabelle 4, 5, 6, 7 dimostrano *che nessuna delle acque sorgive, comunque captate, risente l'influenza delle piogge autunnali e delle inondazioni dell'Aniene. Ciò viene confermato anche dalle analisi batteriologiche sistematicamente fatte* (1) *da altri osservatori. Risulta pure che*

(1) Loc. cit.

la sabbia del fondo della 2ª Serena possiede un gran numero di batteri (in media circa 620 per cmc.); *e in tutte le opere di presa* (eccetto nella 1ª Serena) *le pellicole o le raschiature o gli stillicidi della volta e delle pareti contengono sempre gran numero di batteri, che arrivano al massimo dove l'acqua è più esposta al contatto dell'aria esterna, e le opere stesse hanno più superficie libera, fuori di quella bagnata dall'acqua.*

C) *Durante il disgelo delle nevi in montagna.*

3º periodo di osservazioni: 26-27 aprile 1902. — Poichè questa causa di variazione dell'acqua Marcia dev'essere diffusa, se esiste, limitammo a 2 giorni l'osservazione delle principali acque sorgive; aumentammo però il numero dei campioni d'ogni acqua messa in coltura giorno per giorno.

Le tabelle 9, 10, 11 dimostrano che *il disgelo delle nevi nel bacino imbrifero non influisce affatto sulla composizione batteriologica delle sorgenti dell'acqua Marcia, e confermano che il maggior numero dei germi e delle rispettive oscillazioni, siano pur lievi, s'incontra nella sorgente captata coi più vecchi criteri: si conferma pure che in questa ultima la sabbia del fondo contiene un alto numero di batteri.*

Riunendo in una tabella riassuntiva (pag. 826) i *risultati generali delle analisi batteriologiche dell'acqua Marcia alle sorgenti*, si vede ancora una volta come l'acqua *di tutte le sorgenti si mantiene sempre, nei vari periodi dell'anno, batteriologicamente pura; ma già addosso alle pareti e alla volta delle opere di presa o al fondo dove si deposita della sabbia, si rincontrano rigogliose vegetazioni batteriche, le quali, distaccandosi, possono già essere la causa di qualche irregolare oscillazione del numero dei batteri dell'acqua.*

Queste vegetazioni batteriche giungono al minimo nella prima Serena, le cui opere di presa sono le più perfette, al massimo nella seconda Serena, la di cui presa è la più antica e quindi la meno perfetta.

Se si vuole dunque mantenere batteriologicamente e costantemente pura un'acqua condotta, le opere di presa delle sorgenti devono escludere, il più possibile, tutto ciò che dal punto di vista costruttivo è superfluo, come le vasche o le mostre che mettono per necessità le acque in ampio contatto con l'ambiente esterno; e l'ambiente interno delle stesse opere di presa deve essere protetto in modo che l'aria esterna non vi arrivi se non filtrata, e col terreno o con l'acqua superficiale o con l'uomo non vi possa mai penetrare nulla di estraneo.

2). Batteriologia dell'acqua Marcia lungo gli acquedotti.

A) *Dalle sorgenti a Tivoli* (1).

Sono due gli acquedotti, entrambi in muratura e a corso o pelo libero dell'acqua (vedi Tav. XIV).

Il primo acquedotto, o acquedotto vecchio fu compiuto nel 1870 e risulta:

In cavo aperto per	M. 11,959
In sifone murato	» 85
In galleria	» 11,960
Su ponti e muri di sostruzione	» 2,809
Totale . . .	M. 26,809

Passa nel primo tratto per terreni torbosi e in parte cuorosi e sommergibili con le inondazioni dell'Aniene. Ha una pendenza di m. 131.23,

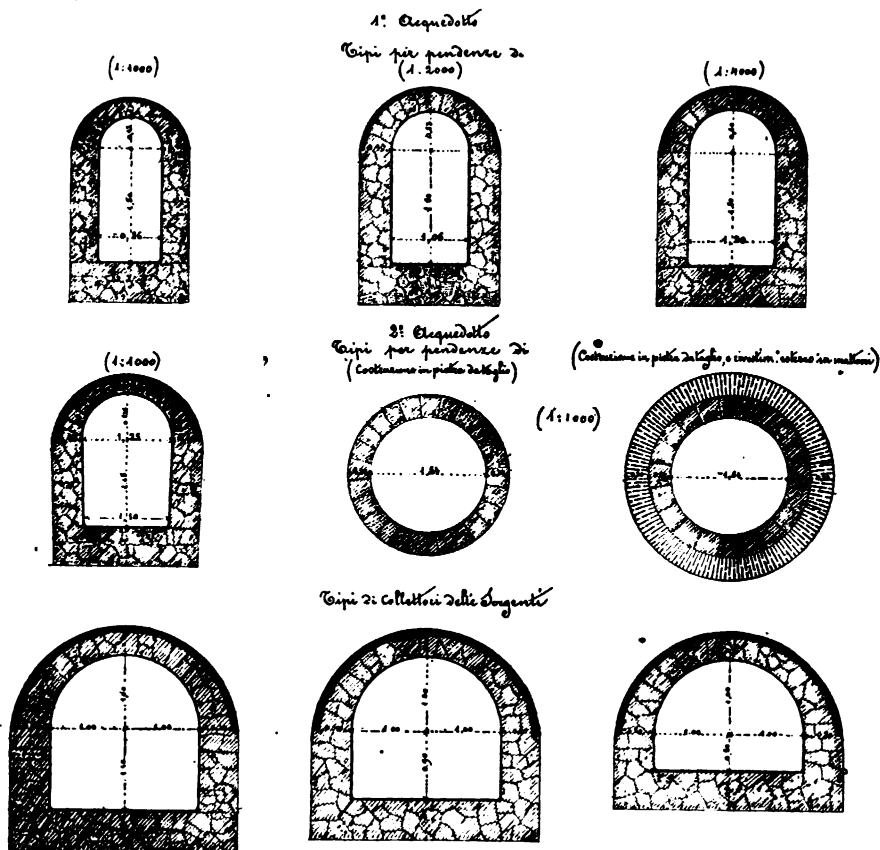


Fig. 17.

dei quali ne assorbe m. 19.55 l'acquedotto propriamente detto, i residui m. 111.68 si esauriscono nelle varie cadute costruite per seguire i naturali declivi del terreno, e nei sottopassaggi di fossi e torrenti. Le sezioni (fig. 17)

(1) Dalla sopra citata monografia inedita dell'Ing. Sinibaldi.

sono quelle usate dagli antichi: cioè una platea a fondo piano, due piedritti verticali, con le coperture a volta cilindrica. I sifoni in muratura hanno sezione circolare all'interno, quadrata all'esterno.

Ai piedi di ogni caduta v'ha un pozzo per smorzare l'urto dell'acqua. Lungo tutto il percorso una zona di terreno, zona *vacua* degli antichi, larga m. 9.00 protegge l'acquedotto. La portata con un'altezza di m. 1.50 è di litri 1386 al 1″.

Il secondo acquedotto, acquedotto nuovo, fu terminato fino a Tivoli nel 1898: dopo Tivoli si unisce all'acquedotto vecchio, per breve tratto, fino al serbatoio. Fu costruito in modo molto più perfetto in confronto al primo.

Venne scelto un tracciato che evita terreni paludosi e lunghe costruzioni: nel sottopassaggio dei torrenti e nella traversata delle grandi valli si usarono tubi di ghisa.

A costruzione interamente compiuta risulterà:

In cavo aperto per	M. 17,002.95
In sifoni di ghisa	» 1,276.80
In galleria.	» 10,532.94
In sostruzioni	» 333.31
Totale . . .	M. 29,146.00

Ogni singola sorgente può, quando vogliasi, escludere.

Le comunicazioni fra il nuovo acquedotto e il vecchio (fig. 18) sono fatte per mezzo di bottini con apposite saracinesche. Le sezioni (fig. 17) sono varie secondo le pendenze; cioè o rettangolare, per evitare cavi profondi in terreni bassi o paludosi; circolare, per opporsi alla spinta del terreno nelle

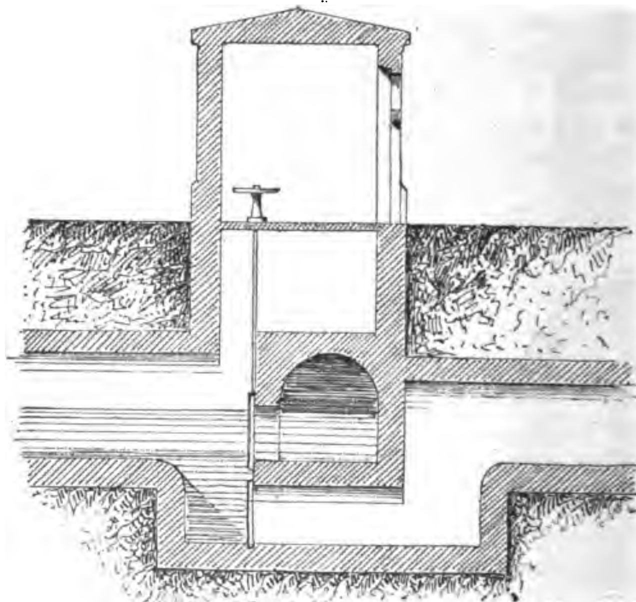


Fig. 18.

gallerie franose; trapeziale, e questa fu la più usata lungo la massima parte dell'acquedotto.

Della pendenza totale in m. 131.16 fra sorgenti e serbatoio, m. 23.16 furono adibiti per la pendenza dell'acquedotto, m. 28.07 pei sifoni in ghisa, m. 80.00 per le cadute. La velocità media dell'acqua è tale che le variazioni delle sorgenti incominciano a risentirsi al serbatoio (distanza 29 km. circa) dopo ore 2.30 e raggiungono lo stato normale dopo 5 ore. A speco pieno la portata è di litri 2,300 al 1″.

Le murature sono a stagno, cioè di calce grassa, pozzolana e pietra; la sezione interna è rivestita di cemento per mm. 15, sopra intonaco di calce e pozzolana; la sezione esterna in trincea e fuori terra, è ricoperta di cappa in calcestruzzo di m. 0.10 di spessore, e a sua volta verniciata di catrame, che si oppone alla penetrazione delle radici.

Nei sottopassaggi e nei siti acquitrinosi è disposta una rete di drenaggio sotto il piano dell'acquedotto nuovo.

Nelle cadute (fig. 19) si hanno manufatti con chiusure.

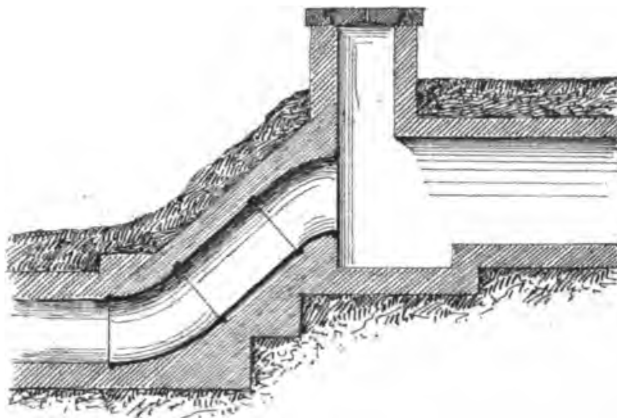


Fig. 19.

I vari tombini (fig. 20) di accesso hanno le pareti interne rivestite di cemento e chiusure in ferro e lastre di calcare.

Come vedemmo all'unione delle sorgenti, così ai chilometri 4, 9, 19 lungo gli acquedotti si hanno delle *stazioni idrometriche con apparecchi scriventi autoregistratori* di ogni anche minima variazione della portata.

La *temperatura* dell'acqua in tutto il percorso, dalle sorgenti al serbatoio, aumenta di solo 1 C.

Nell'ultimo tratto, per m. 1709 circa sopra Tivoli, l'acquedotto nuovo si continua nel vecchio fino al serbatoio di Quintiliolo.

PRIMI SAGGI DI ANALISI BATTERIOLOGICHE. — Furono eseguiti nel gennaio e nel marzo 1900 e diedero in vari punti di ambedue gli acquedotti un numero molto basso di germi, come si vede nelle tabelle 13 e 14 (pag. 827).

ANALISI BATTERIOLOGICHE SISTEMATICHE. — È noto come la parete interna degli acquedotti murati, dopochè da più o meno tempo sono in funzione, diventa viscida come se fosse insaponata. Perciò volemmo vedere da che questo dipenda, e se, in ogni caso, le vegetazioni batteriche, osservate sulle pareti delle opere di presa delle varie sorgive, si sviluppano anche nell'acquedotto in muratura.

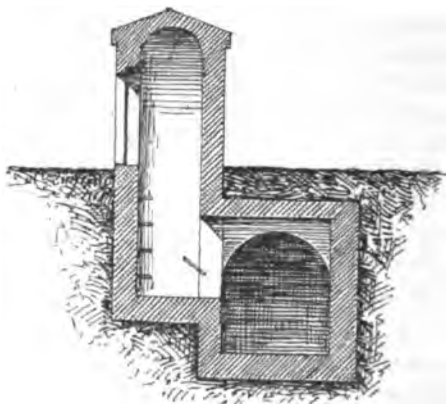


Fig. 20.

Santori (1) aveva già supposto una moltiplicazione batterica nell'interno dell'acquedotto murato, per ispiegare una oscillazione straordinaria di batteri che si verificò nel 1896 nell'acqua Marcia in città. E noi con le nostre ricerche dirette del maggio 1901 (tab. 15) mettemmo fuori ogni dubbio che: *aderente alla muratura interna di cemento impermeabile, in ispecie nella parete sopra il pelo dell'acqua si sviluppano rigogliose pellicole più o meno spesse, costituite da un numero stragrande, infinito di batteri.*

Ciò venne indirettamente confermato dalle analisi che facemmo nel settembre 1901.

Volevamo cioè vedere *come i batteri si distribuiscono in uno stesso campione d'acqua Marcia preso lungo il centro o lungo le pareti degli acquedotti.*

Abbiamo scelto perciò il punto di unione delle varie sorgive, cioè all'inizio dell'acquedotto nuovo presso la casa di Guardia.

Abbiamo prelevato alla superficie dell'acqua due campioni di 25 cc. ciascuno, l'uno al centro della corrente, l'altro accanto alle pareti,

---

(1) *Perizie*, ecc. Loc. cit.

ed abbiamo messo in coltura separatamente cc. per cc. dei due campioni.

Nella tabella 16, che ci dice il risultato ottenuto, si vede subito che:

In uno stesso campione di acqua i batteri si distribuiscono irregolarmente per ogni cmc. dell'acqua stessa: l'oscillazione va da 1 a 110 nel centro della corrente, da 4 a 198 lungo le pareti.

In generale poi *il numero dei batteri verso la periferia è maggiore che nel centro della corrente, e ciò anche perchè la velocità al centro è di m. 1.20 mentre addosso alle pareti è di m. 0.70 circa.*

Inoltre nelle colture occorre spesso di vedere patine costituite da colonie di batteri della medesima specie, il che viene ad indicare come questi germi possono nell'acqua stessa aggrupparsi in forma di zooglee (2).

Contemporaneamente, e come controllo alle suddette analisi delle sorgenti nelle varie condizioni meteorologiche, abbiamo proceduto ad accurate e ripetute analisi batteriologiche tanto dell'acqua degli acquedotti, nel centro e verso le pareti, quanto delle pellicole e delle raschiature della volta e delle pareti.

Le tabelle 17, 18, 19 espongono chiaramente i singoli risultati ottenuti.

La tabella 20 (pag. 834) riassume questi risultati.

Si viene così a dimostrare indubbiamente che *i batteri, dentro gli acquedotti in muratura, vegetano rigogliosamente, anche in forma di pellicole, addosso alla parete interna sotto e sopra il pelo libero dell'acqua, fino sulla volta da cui sgocciolano con l'acqua di condensazione:* addosso alle pareti formano quel suddetto intonaco viscido e ben noto a chi vi pratica dentro: l'umidità, la temperatura uniforme, la mancanza di luce, favoriscono indubbiamente questa vegetazione: i resti dei batteri che muoiono dànno il sustrato nutritivo a quelli che vi si sviluppano.

Una volta dimostrata così indubbiamente la flora batterica che rigogliosamente cresce in forma di pellicole e zooglee nell'interno degli acquedotti in muratura, sulle pareti e sulla volta, bisognava dimostrare se, bruscamente elevando il livello. pel distacco delle suddette pellicole cresce il numero dei batteri nell'acqua, e può essere questa una delle cause delle oscillazioni batteriche nelle acque condotte.

Facemmo perciò varie serie di esperienze: la 1ª serie il 4 set-

(1) Nei pozzi tubolari metallici C. Fränckel aveva già segnalato le formazioni di queste zooglee, che furono poi supposte anche dal Bordoni — Uffreduzzi nell'acquedotto di Milano. Loc. cit.

tembre 1901 (tabella 21); la 2ª serie il 22 dicembre 1901 (tabella 22) e la 3ª serie il 12 luglio 1902 (tabella 23).

La fig. 21 ci dice come in una di queste oscillazioni dell'acqua nell'acquedotto oscillò parallelamente il numero dei batteri.

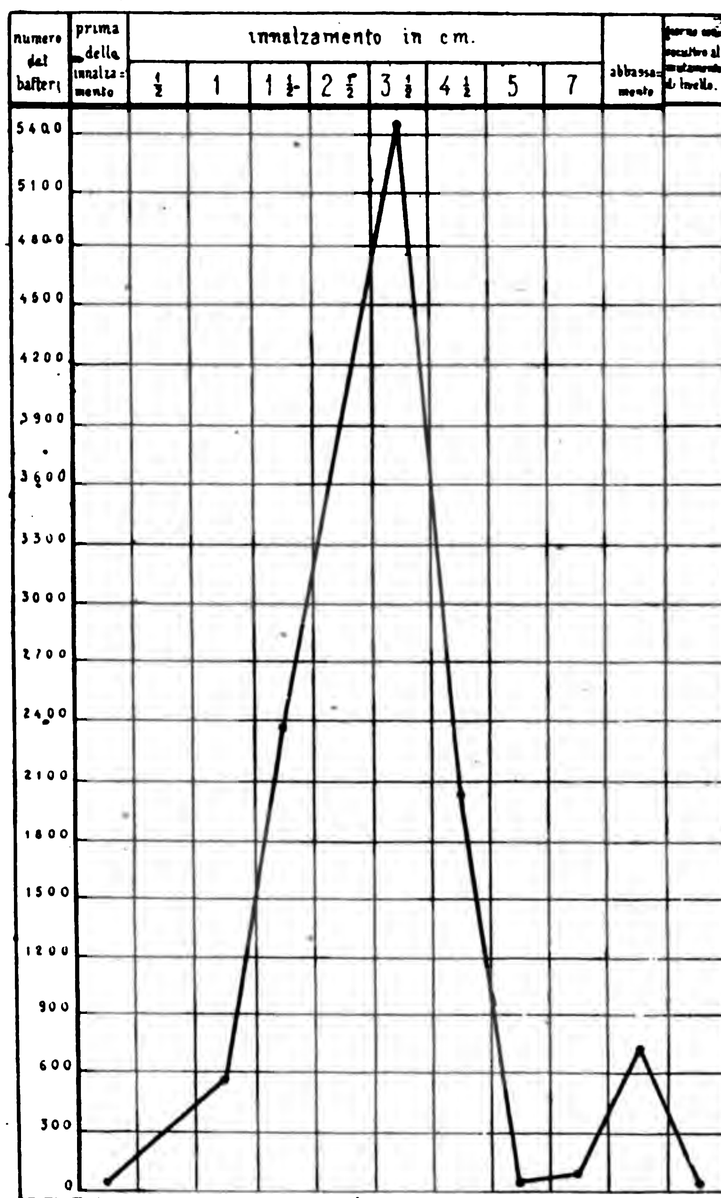


Figura 21.

E quindi si dimostra che basta *elevare il livello della corrente nell'acquedotto murato per vedere aumentare nell'acqua il numero dei batteri in proporzione del grado di aumento di livello.*

Non sempre però l'aumento dei batteri per questa causa si manifesta in singoli campioni o singole prese d'acqua in città; non si potè quindi rilevare con ripetute analisi fatte nella bocchetta dell'Istituto d'igiene dal 12 al 13 luglio (tabella 24) nelle ore nelle quali si sarebbe dovuto risentire in città.

Il che non deve far meraviglia se si pensa come in diversi punti della condottura si possono già in condizioni ordinarie avere diversi risultati dell'analisi batteriologica; e a parte la difficoltà di calcolare con esattezza matematica l'arrivo di una data massa d'acqua dalle sorgenti alla città, si deve pur tener conto del rimescolamento che avviene con l'acqua antecedente e susseguente, che sono più povere di batteri.

Tanto è vero che mentre nell'acquedotto ci fu, durante l'elevazione di livello, un momento in cui l'acqua si fece opalescente, in città nessuno se ne accorse e nessuno ebbe a reclamare.

***

Per terminare lo studio batteriologico dell'acqua negli acquedotti a pelo libero volemmo vedere se *nei giorni di vento che solleva densa polvere della strada in prossimità dei tombini*, costruiti per la vigilanza degli acquedotti e pei sottopassaggi a sifone, avvenendo, a porte dei manufatti aperte, un'aspirazione della polvere stessa, ne seguisse pure un aumento del numero dei batteri dell'aria aspirata.

La tabella 25 dimostra un *lieve aumento di batteri per l'aspirazione e per la mescolanza dell'aria esterna polverosa all'acqua dell'acquedotto:* onde la necessità che la comunicazione fra l'interno e l'esterno degli acquedotti, come dicemmo già per le opere di presa, venga fatta in modo che non possa entrare se non l'aria filtrata attraverso uno spesso strato di muratura o di feltro.

B) *Da Tivoli a Roma.*

Serbatoio di Quintiliolo. — È un antico serbatoio detto così da Quintiliolo Varone, che aveva in questi dintorni una villa. È formato (fig. 22 - pianta e sezioni) da una vasca rettangolare lunga m. 30, larga m. 10, alta m. 3.60, ricoperta con volta a crociera, poggiante su pilastri. È costruito in calcestruzzo, ed è perfettamente mantenuto.

Più che da serbatoio funziona da camera di calma, ove l'acqua è obbligata a sormontare 3 muri che la dividono in 4 vasche.

È annesso al serbatoio un castelletto idrometrico che ripartisce l'acqua ai 3 *sifoni di ghisa.*

Questi furono costruiti rispettivamente negli anni 1870, 1881, 1886. Originano da pozzuoli separati ad una profondità di circa m. 3 sotto il livello normale dell'acqua. Sono larghi m. 0.660, lunghi in tutto m. 79.745 (circa 80 km.), percorrono (Tav. XIV) quasi in linea retta la campagna romana, o posati in cavo a 2 metri di profondità, nei terreni paludosi sopra platea murata, o in galleria attraverso le colline; affiorano sui piccoli fossi facendo da ponte, e sui maggiori corsi d'acqua poggiando sopra ponti in muratura.

Entrano in città il 1° e il 3° fra le porte Pia e Salaria, il 2° per la barriera Tiburtina.

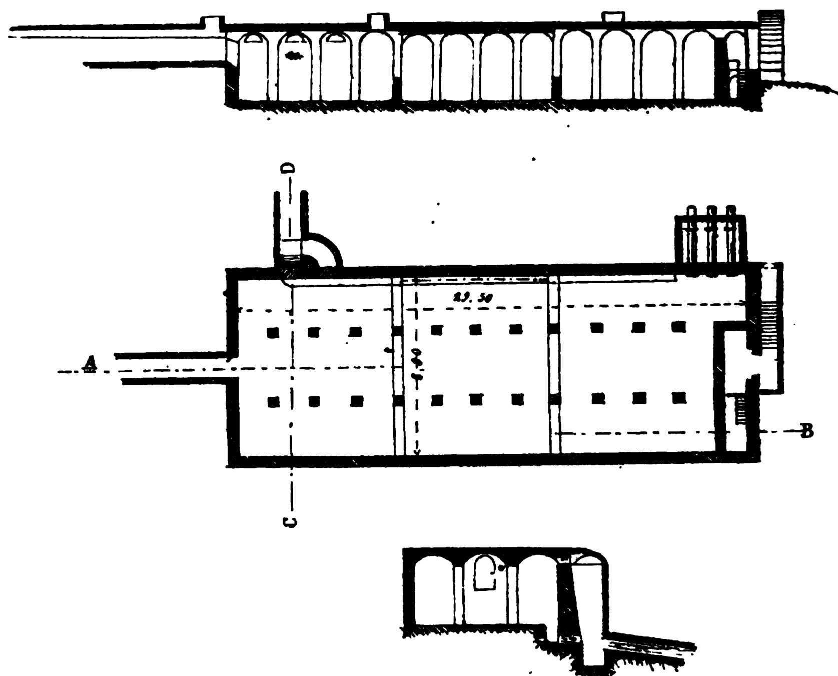


Fig. 22.

Gli scarichi e sfiatatori a chiusura automatica sono dentro piccole camerette in muratura, chiuse con porte di ferro.

A Quintiliolo, al 10° km., all'ingresso in città sono impiantate le già dette *stazioni manometriche.*

La *temperatura* dell'acqua attraverso l'arida e brulla campagna romana aumenta in estate al massimo da 10° C a 11° C a 12° 5.

Per seguire passo passo la batteriologia dell'acqua Marcia sino al suo arrivo in Roma, abbiamo anzitutto (vedi tab. 26) pensato di raccogliere campioni d'acqua successivamente dalle origini dell'ac-

quedotto nuovo in giù, e per modo che, calcolando la veloctià dell'acqua nel suo percorso, si venisse ad attingere per quanto era possibile, alla stessa massa progrediente delle sorgenti fino all'arrivo in città.

Dalla tabella a pag. 843, si vede che *in condizioni ordinarie la flora batterica per un lungo tratto di ben 26 km. dalle sorgenti all'arrivo in città non varia.*

Le tabelle 27, 28 confermano che la flora batterica non varia dal serbatoio di Quintiliolo fino all'arrivo dei sifoni in città.

3. Batteriologia dell'acqua Marcia nella città.

La distribuzione dell'acqua Marcia nella città è fatta col sistema radiale delle diramazioni normali. Dai sifoni si distaccano le condotture principali: ciascuna di queste alimenta una zona della città per mezzo di condotture secondarie o terziarie, in ragione di un massimo consumo di litri 200 a testa e sempre con una disponibilità all'estremo della condottura principale.

Delle comunicazioni sono interposte, pei casi di bisogno, fra le varie zone di distribuzione. Le manovre si fanno al solito per mezzo di saracinesche (fig. 23).

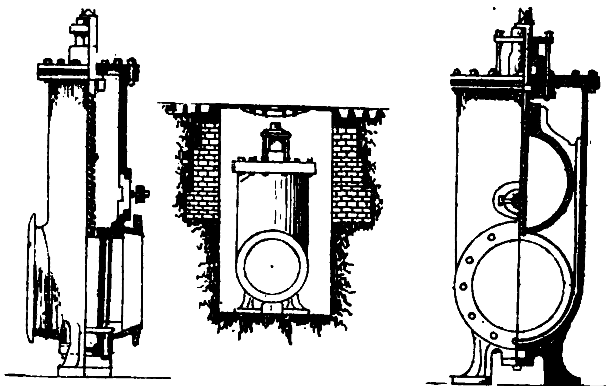


Fig. 23.

Stazioni manometriche, come quelle già descritte, sono impiantate sia nella canalizzazione urbana, sia all'ufficio centrale della Società. Così *coi diagrammi degli apparecchi auto-registratori, dalla sorgente all'ufficio centrale, seguonsi, passo passo, tutte le fasi della distribuzione dell'acqua;* sorveglıansi le operazioni di manutenzione e dei fontanieri; misuransi i danni delle fughe, le rotture dei tubi, le sottrazioni di acqua. E come da un osservatorio, all'ufficio centrale, ove arrivano ogni giorno i diagrammi delle singole stazioni manometriche, il direttore tecnico vigila in modo continuo e sensibilissimo tutte le condotture dalle sorgenti alle ultime diramazioni.

Un tale sistema di vigilanza del servizio dell'acqua, mediante le stazioni manometriche, non si può mai abbastanza raccomandare ad ogni ufficio d'igiene municipale e ad ogni impresa di condottura d'acqua.

In tutte le diramazioni stradali di città, fino ai punti più lontani dai sifoni la *temperatura* arriva al più a 13. 5° C.

La *distribuzione nelle case* è a getto continuo, costante, ch'è il più raccomandabile quando l'acqua sia abbondante e a buon prezzo (nel nostro caso da 4 a 15 cent. per mc.): ne viene anche l'incalcolabile utilità igienica del lavaggio continuo delle fogne mediante l'acqua che si riversa coi sopravanzi.

È fatta nelle condotture stradali con prese in carico munite di rubinetto di arresto, con chiusino per la manovra e luci di misura in vetro.

Il contatore o meglio il *misuratore* (fig. 24) consta di un recipiente cilindrico munito di un tubo sfiatatore (*h*) in alto, di un tubo efferento o portatore (*b c*), di un tubo di scarico (*e f*), e di un tubo efferente che porta l'acqua alla cassetta (*a*) di ripartizione pei vari piani della casa. Il misuratore propriamente detto è in *d*, lungo il tubo efferente, e consta di una chiusura procurata con una diminuzione di sezione nel tubo portatore; si hanno due dischi soprapposti di vetro; la loro maggiore o minore apertura modera la quantità di acqua.

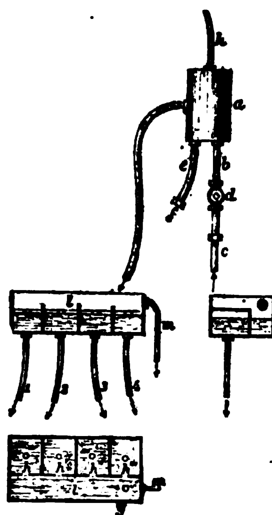


Fig. 24.

Tutto ciò produce un arresto alla corrente dell'acqua.

Il *tipo di distribuzione dell'acqua nelle case* è triplice, ascendente, discendente e misto (fig. 25-28).

Col primo (fig. 25) si ha l'acqua direttamente dalla canalizzazione stradale, e quindi si può dire dalle scaturigini: la distribuzione si fa direttamente alle cucine dal tubo portatore; il sopravanzo viene utilizzato pei cessi, pei bagni, e per il lavatoio del pianterreno.

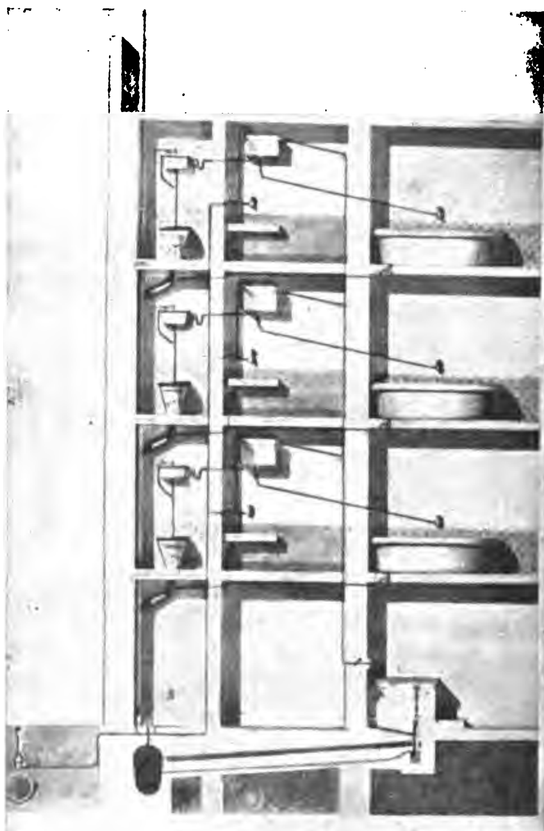


Fig. 25.
Tipo ascendente con distribuzione diretta alle cucine e utilizzazione del sopravanzo pei cessi, pei bagni e pel lavatoio.

Col secondo tipo (fig. 26-27) l'acqua in alto della casa soffermasi più o meno nei cassoni di distribuzione da cui partono i tubi pei singoli usi domestici. Se ne usano due varietà. Con una (fig. 26) l'acqua dalla cassetta di ripartizione, in alto, arriva direttamente alle cucine, e, per mezzo di serbatoi separati, arriva ai cessi e ai bagni: il sopravanzo va al lavatoio.

Con l'altra varietà (fig. 27) dalla cassetta di ripartizione l'acqua va in serbatoi separati per uso dei cessi, dei bagni e delle cucine: il sopravanzo va sempre al lavatoio.

Col tipo misto (fig. 28), cioè ascendente e discendente, l'acqua direttamente dal tubo portatore ascendente si distribuisce alle cucine; e dal serbatoio, in alto, scende separatamente alle latrine ed ai bagni: il sopravanzo, al solito, va al lavatoio.

Già Sanfelice e Oreffice (1) notarono gl'inconvenienti del tipo discen-

(1) Loc. cit.

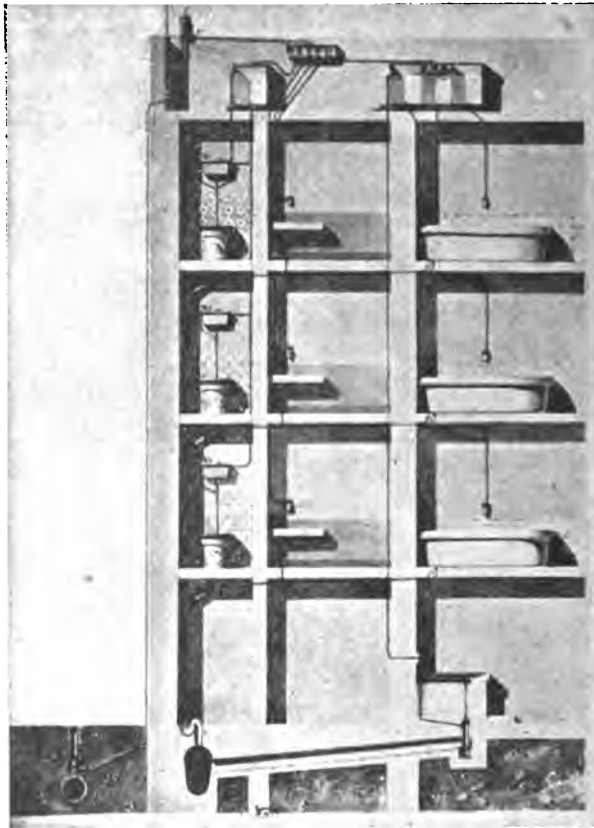


Fig. 28.
Tipo discendente con cassetta di ripartizione direttamente alle cucine, serbatoi separati ai cessi e ai bagni, e con sopravanzo al lavatoio

dente, più in uso nei quartieri più poveri e in genere nelle case di affitto, ove i proprietari per economia conducono l'acqua soltanto secondo questo secondo tipo di distribuzione.

S'aggiunga che nei quartieri poveri e vecchi si ha il minimo di consumo cioè 0.03 per 100 mq., mentre a distribuzione completa nei quartieri ricchi si ha invece il 0.06, cioè il doppio.

E non di rado s'incontrano impianti malfatti, come si dimostrano nelle fig. 29 e 30, con la comunicazione diretta fra la fognatura e la distribuzione dell'acqua nella casa.

Da quanto è sopra esposto risulta che tanti ostacoli al libero deflusso dell'acqua nella sua distribuzione e quindi altrettanti luoghi ove si può depositare ciò che v'ha in sospeso, possono essere: *Saracinesche*, *misuratori* o lenti di misura, *serbatoi* o cassoni.

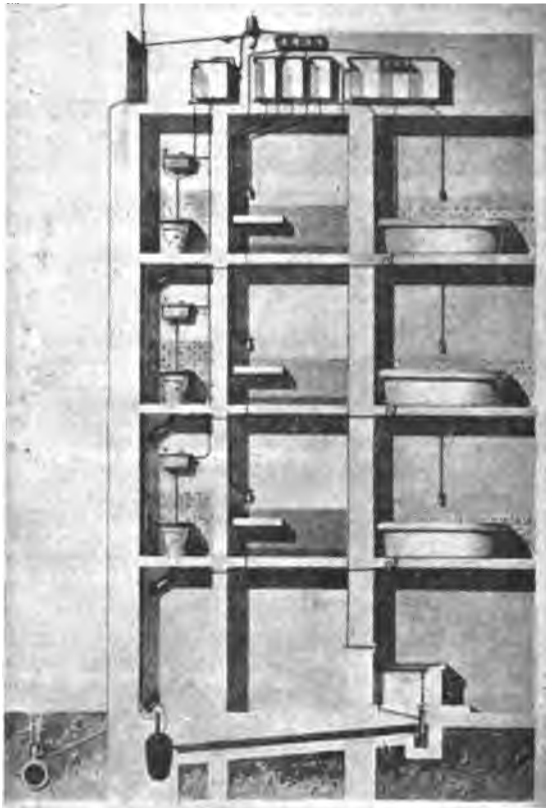


Fig. 27.
Tipo discendente con cassetta di ripartizione
e serbatoi per uso dei cessi, cucine, bagni e sopravanzo al lavatoio.

Quando questi ostacoli non sono messi in movimento *il numero dei batteri nell'acqua Marcia, per tutto il tragitto da Tivoli a Roma dentro i sifoni, resta, si può dire, immutato* (v. tabella 28).

Ma quando i suddetti ostacoli son messi in movimento, esercitano una grande influenza sulla composizione batteriologica dell'acqua Marcia.

Saracinesche. — Furono fatte appositamente il 22 giugno 1900 alcune manovre di saracinesche allo sbocco del 3° sifone: l'acqua fu presa in più punti, prima e dopo l'apertura delle saracinesche: in via delle Grazie e a piazza Venezia si vide l'acqua, dopo l'apertura, manifestamente torbida: sempre poi (vedi tab. 29) dopo la manovra *salì il numero dei batteri* da 2 a 503, da 39 a 2765, da 1 a 80.

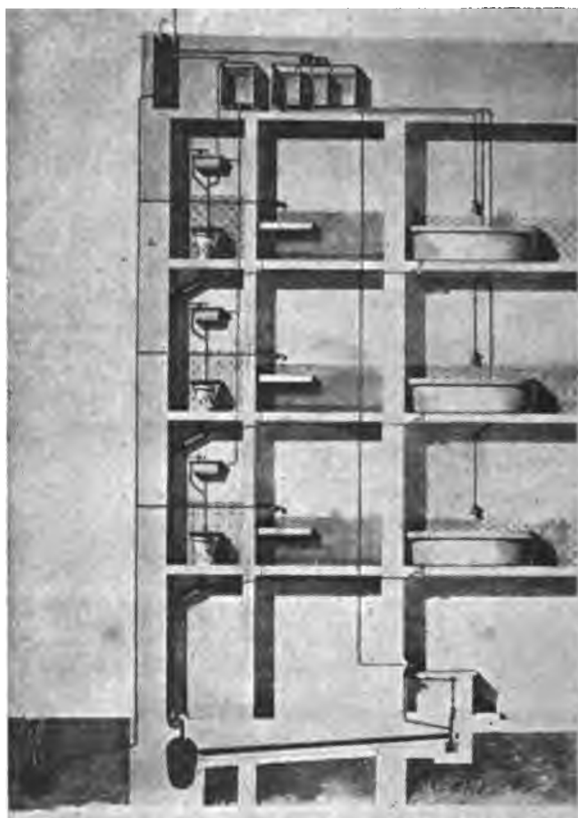


Fig. 28.
Tipo misto; ascendente, con distribuzione diretta del tubo portatore alle cucine, discendente, cioè coi serbatoi in alto separatamente alle latrine e ai bagni, e sopravanzo al lavatoio.

L'acqua può persino divenir torbida per la mescolanza di una sabbia fine, rossastra, contenente una varia proporzione di

	Per 100 parti	
Ossido ferrico	3.05	83.07
Carbonati terrosi (con un pò di sabbia silicea)	96.95	16.93

Trattasi cioè di un deposito di sabbia fina che proviene dalle sorgenti e dai composti di ferro che si formano per l'azione delle sostanze gazzose sulle paratoie, saracinesche e condotture d'acqua di ghisa. Il deposito talvolta è giallo per ossido ferrico, talvolta è verde per ossido ferroso, che molto probabilmente si forma per

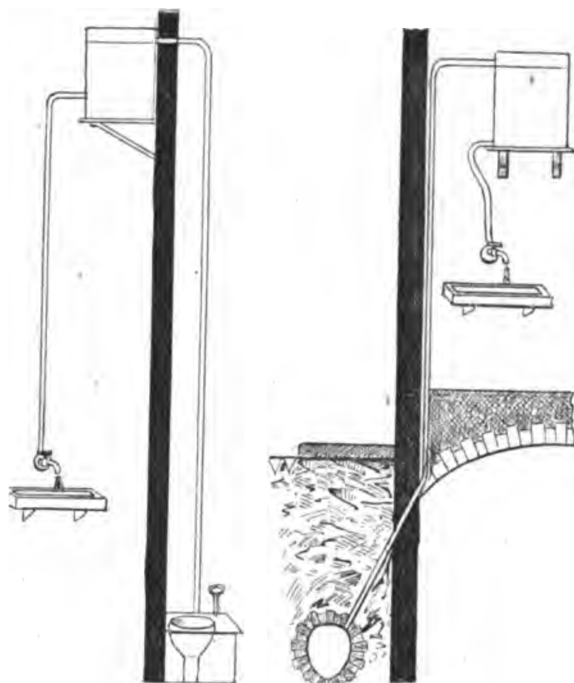


Fig. 29.

difetto di ossigeno, il quale in parte è sottratto dalle materie organiche presenti e trasformate dai batteri.

Di questo deposito, ch'è un buon sustrato di coltura dei batteri acquatili, se ne forma continuamente nei luoghi di calma, e se ne possono accumulare notevoli quantità, che se, entrando in circolo, giungono ad intorbidare l'acqua, lo si attribuisce erroneamente alle pioggie o ad estranee infiltrazioni alle sorgenti o lungo le condotture.

Un caso tipico di questo genere capitò nell'abitazione di uno di noi il 16 marzo di quest'anno 1903.

Era giorno di pioggia e l'acqua, che arriva a getto continuo direttamente dalla strada, d'un tratto si fece torbida, e tale si mantenne per circa 15 minuti.

Raccolta la più torbida e la meno torbida mostrò il solito deposito di sabbia rossastra. Messa in coltura sviluppò, la più torbida, 151,200 colonie in agar, dopo 48 ore e 23,700 colonie in gelatiaa dopo 24 ore; la meno torbida in agar sviluppò 99,760 colonie in 48 ore, in gelatina dopo 24 ore 49,600.

Intanto la gente di casa diceva che *l'acqua Marcia si era intorbidata perchè pioveva.* Invece, prese informazioni si seppe dall'ufficio

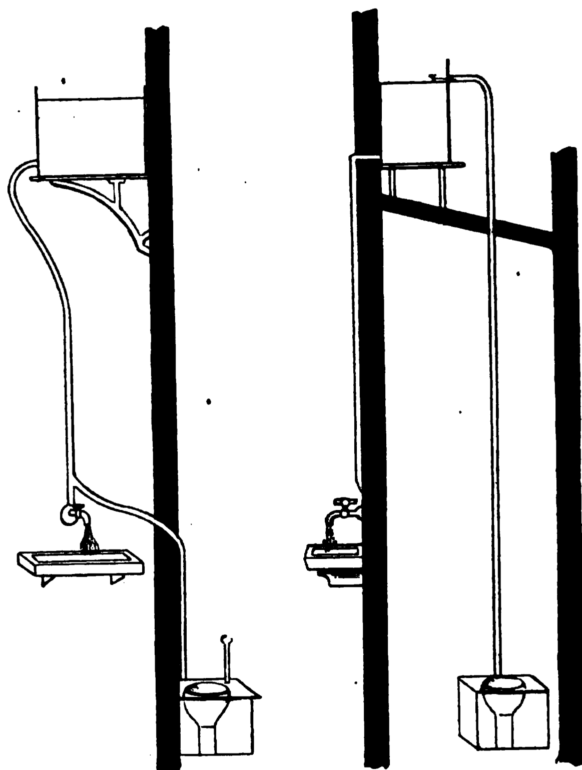


Fig. 30.

tecnico che s'era fatta una manovra di saracinesche per sistemare una condottura nella prossimità di piazza Termini.

Un'altra prova dell'intorbidamento dell'acqua, a causa dei suddetti depositi di sabbia nelle condotture stradali, l'avemmo quando per la sistemazione della piazza dell'Esedra si tolse l'acqua nelle condotture di piazza di Termini e di via del Quirinale.

Aspettammo perciò a lavoro finito, il 25 marzo p. p. il nuovo arrivo dell'acqua all'Istituto d'igiene e nella casa di uno di noi.

L'acqua nel suo primo arrivo era torbida, l'intorbidamento era dovuto alla sabbia sopradescritta; dopo 15-20 minuti era di nuovo perfettamente limpida e senza più alcun deposito visibile. Ecco i risultati dell'analisi batteriologica della 1ª acqua torbida e della 2ª chiara.

TABELLA *D*.

Data	Luogo di presa		Numero delle colonie al 4° giorno dalla semina
25 marzo 1903	P. S. Bernardo 109	1ª acqua (torbida)	792,000
		2ª acqua (limpida)	21
	Istituto d'igiene	1ª acqua (torbida)	293,000
		2ª acqua (limpida)	33

Si veniva dunque a confermare che dentro la rete stradale della distribuzione dell'acqua Marcia si accumula, nei punti morti, un deposito di sabbia calcarea e ferrugginosa che trattiene e forse coltiva i batteri acquatili; cosicchè questi aumentano nell'acqua, che si fa più o meno torbida, quando quella sabbia, per una ragione o per l'altra, si rimescola colla corrente (1).

Altri punti dove la suddetta sabbia si arresta, e per conseguenza vi si accumulano i batteri acquatili, sono i già descritti *misuratori* (lenti di misura) *dell'acqua.*

Difatti se si muove la lente di misura viene subito fuori un'acqua torbida per la solita sabbia giallo-rossastra, o giallo-verdastra: dopo 2-5 minuti, quando la corrente ha spazzato via tutta la sabbia, l'acqua torna a fluire limpida.

Raccogliendo l'acqua prima e dopo dell'apertura del contatore si hanno dalle colture i risultati esposti nelle tabelle 30 e 31.

Dove si vede che tranne al ponte Margherita, ove l'acqua prima e dopo l'apertura del misuratore rimase limpida, divenne altrove più o meno torbida e coll'intorbimento crebbero sempre i batteri da 49 a 4002, da 25 a 643, da 27 a 2920, da 24 a 19,600.

Cosicchè anche i misuratori sono un luogo di arresto delle sabbie e dei batteri acquatili.

Alcuni germi vi si possono anche moltiplicare: citiamo ad esempio il micrococco sottile, la streptothrix albida, il batterio ceruleo, il batterio micoide.

Abbiamo voluto studiare nel luglio scorso più minutamente questo fenomeno del deposito dei batteri fra la sabbia dei condotti terminali (a sbocco chiuso e aperto) dei robinetti misuratori, e dei serbatoi delle case.

La tabella 32 ci dà pure la quantità per cento di deposito di sabbia

(1) Che in un'acqua possa con le particelle di sabbia aumentare il numero dei batteri era stato accennato dal dottor Henry Fränkel (V. *Revue d'Hygiène*, ecc., vol. 14, 1892).

(in volume e in peso) dopo l'apertura delle lenti dei misuratori, e l'intorbimento maggiore o minore dell'acqua.

Si vede come non di rado si hanno in coltura patine o colonie o zooglee; il che vuol dire che *certe volte alcuni batteri vi si sviluppano più rigogliosamente.*

Si vede pure come ogni volta s'intorbida l'acqua vi aumenta il numero dei batteri, non però in ragion diretta dell'aumento del deposito, probabilmente perchè non si ha un semplice arresto dei batteri, ma talora eziandio una diversa loro moltiplicazione.

Serbatoi o cassoni. — *Anche questi sono un luogo di arresto e di moltiplicazione dei batteri dell'acqua Marcia.*

Già Sanfelice e Oreffice (1) nei cassoni maltenuti, esposti alla polvere ed alle emanazioni gazzose delle fogne trovarono un lieve aumento di batteri (una volta fino ad un numero incalcolabile) ed un certo aumento di specie, in ispecie di sarcine e muffe.

Eziandio nei cassoni ben fatti ermeticamente chiusi, come quello del nostro Istituto d'igiene, con il deposito della suddetta sabbia nel fondo, si ha pure un deposito di batteri, come si vede nella tabella 33.

Sicchè nella rete urbana di distribuzione dell'acqua Marcia, ed in ispecie nelle tubature stradali vicino alle saracinesche, nelle condotture delle case presso i misuratori e dentro i serbatoi, insieme col deposito di sabbia ferrugginosa calcarea si ha un arresto, talora forse anche una moltiplicazione di batteri acquatili; e qualsiasi corrente trasporti le dette sabbie fa aumentare di molto il numero dei batteri acquatili.

4) Batteriologia dell'acqua Marcia nel suburbio e nell'Agro Romano.

Una speciale condottura a pressione con un carico di 15 atmosfere è destinata per le colline di *Monte Mario e del Gianicolo* che sono dagli 80 ai 150 metri sul livello del mare.

Questa condottura corre per 16 chilometri nella campagna romana, a lato dei grandi sifoni, nell'atmosfera fredda che ne emana, e così non sale che di 2°.5 centigradi la temperatura dell'acqua.

Per soli 6 chilometri corre separatamente fino a Monte Mario, sulla destra del Tevere, e in questo breve percorso la *temperatura* sale rapidamente a 18°.

(1) Loc. cit.

In una delle diramazioni terminali di questa speciale condottura fu raccolta l'acqua il 5 luglio 1902 e fu trovata batteriologicamente purissima, con una media di soli 21 batteri per cmc.

Ma bastava manovrare anche qui il misuratore per avere subito per pochi minuti l'acqua torbida e con un numero incalcolabile di batteri come si vede nella tabella 34.

Nel suburbio si hanno diramazioni radiali, derivate da quelle della città.

Sono così provviste di acqua per vari chilometri le strade suburbane, Flaminia, Salaria, Nomentana, Tiburtina, Prenestina, Casilina, Appia Nuova, Aurelia e Trionfale.

La *temperatura* nèlle ultime diramazioni terminali arriva a 16°, 18°, 23° centigradi.

Quantunque la temperatura dell'acqua cresca, pure non cresce proporzionalmente il numero dei batteri, nemmeno nelle ultime diramazioni terminali, ove pur si mantiene fra 19 e 37 per cmc., come si vede nelle tabelle 35, 36, 37.

Ma anche qui girando le lenti del robinetto misuratore l'acqua si fa torbida, il numero dei batteri sale attorno ai duecento.

Cosicchè *anche nella distribuzione suburbana l'acqua Marcia si mantiene batteriologicamente pura.*

Nell'Agro Romano la distribuzione dell'acqua Marcia si estende sulla riva destra fino al ponte di Magliana e sulla riva sinistra del Tevere fino a Fiumicino per 27 km. da Roma.

A Fiumicino l'acqua arriva con la temperatura da 19° 5' a 20° 2'.

In tutto, la canalizzazione dell'acqua Marcia si estende per 250 km. circa, e serve una popolazione di circa 600,000 abitanti per un'area di più che 12 mila ettari.

Anche nella sua più periferica diramazione di Fiumicino l'acqua si mantiene sempre batteriologicamente pura non solo nelle colonnette o fontanelle pubbliche, ma eziandio nei serbatoi, come si dimostra nella tabella 38.

V. — Analisi batteriologiche qualitative.

Fin dal 1° e 2° periodo di osservazioni batteriologiche alle scaturigini dell'acqua Marcia, abbiamo voluto classificare le specie batteriche, più o meno frequentemente riscontrate nelle singole acque sorgive, all'inizio dell'acquedotto nuovo e in città.

La classifica dei germi è stata fatta tenendo presente il dizionario delle specie batteriche delle acque, elencate dal Migula (1) che ha riunite tutte quelle fin ora trovate.

Per le denominazioni dei germi, abbiamo però creduto più opportuno, quando era possibile, attenerci a quelle entrate nell'uso comune, non essendo la classifica del Migula accettabile da tutti i punti di vista, specie per la difficoltà di tener conto della presenza delle ciglia.

Nella diagnosi delle sarcine abbiamo anche tenuto presente la classifica del Gruber che è quanto di meglio si possa oggidì avere, per cui invece che differenziare solo le tre note specie, rosea, gialla, bianca, ne abbiamo distinte diverse altre.

Anche nella diagnosi delle streptotricee abbiamo seguito quanto di più recente è stato scritto sul proposito, per cui accanto alla comune streptothrix alba abbiamo potuto diagnosticare con sicurezza la streptothrix albida la quale ordinariamente si confonde con la prima.

Seguendo il criterio di Lehmann e Neumann chiamiamo *bacteria* le forme bacillari non sporigene, e *bacilli* le forme sporigene.

Sia fra le prime che fra le seconde abbiamo trovate delle forme difficilmente riferibili a quelle già note, poichè gli autori il più delle volte hanno fornito caratteri assolutamente insufficienti per la diagnosi delle specie.

Così abbiamo trovato un batterio che dà un pigmento giallo ocraceo, è difficilmente coltivabile, e per molti caratteri corrisponderebbe al *b. aurescens* di Frankland, col quale l'abbiamo identificato per evitare inutili creazioni di nuove specie.

Tra i bacilli ne abbiamo trovati alcuni sporigeni, coltivati su patate e corrispondenti ad altri descritti come non sporigeni, e con questi li abbiamo identificati per la stessa ragione sudetta: tali sono i b. gialli di Lustig., l'*aquatilis*, e uno bianco.

Nella determinazione di alcuni germi abbiamo creduto opportuno seguire il Lehmann e il Neumann: così il *proteus vulgaris* lo chiamammo *bacterium vulgare*, il *bacillus mesentericus vulgatus* lo chiamammo *bacillus vulgatus*, e così via.

Ecco l'elenco delle diverse specie isolate alle sorgenti e all'unione delle sorgenti, cioè all'inizio dell'acquedotto nuovo.

---

(1) *System der Bakterien*, 2° vol., Jena, 1900.

PRIMA SERENA.

Specie batteriche	Specie batteriche isolate nell'agosto e settembre 1901	Specie batteriche isolate nel dicembre 1901
Cocchi:	Micrococcus candicans.	Micrococcus candicans.
Micrococcus candicans.	» versicolor.	» citreus di Miquel.
» citreus di Miquel.	Sarcina citrina (Gruber).	» luteus.
» luteus.	» rosea (Schröter).	Sarcina alba Zimmermann.
» versicolor.	Bacterium album.	» citrina (Gruber).
Sarcina alba Zimmermann.	Bacillus mycoides.	Bacterium fluorescens liquefac.
» citrina (Gruber).	Bacterium coeruleum (Smith).	» lutenm.
» rosea (Schröter).	Bacterium luteum (List).	Bacillus aquatilis.
Batteri:	» cremoides.	Penicillium glaucum.
Bacterium album.	Bacillus subtilis.	
» coeruleum (Smith).	» vermicularis.	
» cremoides.	Streptothrix albida.	
» fluorescens liquefac.	Penicillium glaucum.	
» luteum.		
Bacilli:		
Bacillus aquatilis.		
» mycoides.		
» subtilis.		
» vermicularis.		
Streptothrix:		
Streptothrix albida.		
Ifomiceti:		
Penicillium glaucum.		

SECONDA SERENA.

Specie batteriche

Cocchi:

Micrococcus agilis (Ali-Cohen).
» aurantiacus.
» candicans.
» luteus.

Sarcina alba (Zimmermann.
» citrina
» rosea (Schröter).

Batteri:

Bacterium aurantiacum.
» coeruleum (Smith).
» fluorescens liquefac.
» fluorescens non liq.
» luteum.
» rubrum (Migula).
» viscosum.

Bacilli:

Bacillus aquatilis.
» arborescens.
» albus.
» mycoides.
» subtilis.
» vulgatus (Flügge).

Streptothrix:

Streptothrix albida.
» citrea.

Oidii:

Oïdium roseum.

Ifomiceti:

Mucor mucedo.
Penicillium glaucum.

Specie batteriche isolate nell'agosto e settembre 1901

Micrococcus candicans.
» luteus.

Sarcina rosea.

Bacterium coeruleum (Smith).
» luteum.
» rubrum (Migula).
» viscosum.
» fluorescens liquef.

Bacillus aquatilis.
» albus.
» dendriticus.
» mycoides.
» vulgatus (Flügge).

Streptothrix albida.
» citrea.

Oïdium roseum.

Penicillium glaucum.

Specie batteriche isolate nel dicembre 1901

Micrococcus agilis (Ali-Cohen).
» aurantiacus.
» luteus.

Sarcina alba.
» citrina (Gruber).
» rosea.

Bacterium aurantiacum.
» fluorescens liquef.
» fluorescens non liq.

Bacillus aquatilis.
» albus.
» dendriticus.
» mycoides.
» viscosus.
» vulgatus (Flügge).
» subtilis.

Streptothrix citrea.

Oïdium roseum.

Mucor mucedo.

Penicillium glaucum.

Terza Serena.

Specie batteriche.

Cocchi:

Micrococcus agilis (Ali-Cohen).

» candicans.

» aurantiacus.

» citreus liquefaciens.

» luteus.

Sarcina incarnata (Gruber).

» meliflava (Gruber).

Batteri:

Bacterium album.

» aurantiacum.

» coeruleum (Smith).

» fluorescens liquefaciens.

» viscosum.

Bacilli:

Bacillus aquatilis.

» vulgatus (Flügge).

Blastomiceti:

Saccharomyces albus.

Ifomiceti:

Aspergillus niger.

Penicillium glaucum.

Quarta Serena.

Specie batteriche

Cocchi:

Micrococcus agilis (Ali-Cohen).
» aurantiacus.
» candicans.
» cerasinus (List).
» citreus liquefaciens.
» flavus desidens.
» versicolor.

Sarcina alba Zimmermann.
» alutacea (Gruber).
» lutea (Schröter).
» rosea (Schröter).

Batteri:

Bacterium album.
» aurantiacum.
» coeruleum (Smith).
» cremoides.
» fluorescens liquefaciens.
» violaceum.
» viscosus.

Bacilli:

Bacillus giallo di Lustig.
» giallo-limone.
» mycoides.
» vulgatus (Flügge).

Streptothrix:

Streptothrix citrea.

Oidii:

Oïdium roseum.

Ifomiceti:

Aspergillus niger.
Mucor mucedo.
Penicillium glaucum.

Galleria di Santa Lucia.

Specie batteriche

—

Cocchi:

Micrococcus agilis (Ali-Cohen).
» candicans.
» luteus.
Sarcina citrina (Gruber).
» incarnata (Gruber).
» lutea (Schröter).
» meliflava (Gruber).
» pulchra Henrici.
» rosea (Schröter).

Batteri:

Bacterium album non fluid.
» aurantiacum.
» coeruleum (Smith).
» fluorescens liquef.
» fluorescens non liquef.
» viscosum.
» vulgare.

Bacilli:

Bacillus aquatilis.
» mycoides.
» dendriticus.
» subtilis.
» vulgatus (Flügge).

Streptothrix:

Streptothrix citrea.

Blastomiceti:

Saccharomyces albus.
Hefe-rosa.

Ifomiceti:

Aspergillus niger.
Cladosporium.
Mucor mucedo.
Penicillium glaucum.

Specie batteriche isolate nell'agosto e settembre 1901

—

Micrococcus candicans.
» luteus.
Sarcina citrina.
» rosea.
Bacterium album fluid. Maschek.
» coeruleum (Smith).
» fluorescens liquefac.
Bacillus viscosus.
» aquatilis.
» mycoides.
» subtilis.
» vulgatus (Flügge).
Streptothrix citrea.
Cladosporium.
Mucor mucedo.

Specie batteriche isolate nel dicembre 1901

—

Micrococcus agilis (Ali-Cohen).
Sarcina incarnata (Gruber).
» lutea (Schröter).
» meliflava (Gruber).
» pulchra Henrici.
» rosea (Schröter).
Bacterium aurantiacum.
» album non fluor.
» fluorescens liquefac.
» vulgare.
Bacillus aquatilis.
» viscosus.
» vulgatus (Flügge).
Bacterium fluorescens non liquef.
Streptothrix citrea.
Hefe-rosa.
Saccharomyces albus.
Aspergillus niger.
Mucor mucedo.
Penicillium glaucum.

Acquedotto nuovo (inizio).

Specie batteriche

Cocchi:

Micrococcus aquatilis.
» aurantiacus.
» candicans.
» cerasinus (List).
» citreus liquefac.
» citreus di Miquel
» flavus desidens.
» flavus tardigradus.
» luteus.

Sarcina alutacea (Gruber).
» incarnata (Gruber).
» erythromyxa (Král).
» lutea (Schröter).
» rosea (Schröter).

Batteri:

Bacterium album.
» aurantiacum.
» aurescens di Frankland.
» coeruleum (Smith).
» cremoides.
» fluorescens liquefac.

Specie batteriche isolate nell'agosto e settembre 1901

Micrococcus aurantiacus.
» candicans.
» cerasinus (List).
» citreus liquefaciens.
» flavus tardigradus.
» luteus.

Sarcina erythromyxa (Král).
» incarnata (Gruber).
» lutea (Schröter).
» rosea (Schröter).

Bacterium aurescens di Frankland.
» coeruleum (Smith).
» fluorescens liquefaciens.
» luteum (List).
» vulgare.

Bacillus aquatilis.
» mycoides.
» flavocoriaceus.
» subtilis.
» verde-giallo di Lustig.
» vermicularis.
» vulgatus (Flügge).

Specie batteriche isolate nel dicembre 1901

Micrococcus aquatilis.
» aurantiacus.
» candicans.
» cerasinus. (List).
» citreus di Miquel.
» flavus desidens.

Sarcina alutacea (Gruber).
» incarnata (Gruber).
» rosea (Schröter).

Bacterium album.
» aurescens di Frankland.
» aurantiacum.
» coeruleum (Smith).
» fluorescens liquefac.
» fluorescens non liquef.
» nubilum.
» luteum (List).
» violaceum.
» viscosum.
» vulgare.

Bacillus aquatilis
» cyaneo-fuscus Beyerinck.
» giallo di Lustig.

Specie batteriche

Bacterium fluorescens non liquef.
» luteum (List).
» violaceum.
» viscosum.
» vulgare.

Bacilli:

Bacillus aquatilis.
» cyaneo–fuscus Beyerinck.
» mycoides.
» dendriticus.
» giallo di Lustig.
» giallo-limone.
» flavo coriaceus.
» mycoides.
» subtilis.
» verde-giallo di Lustig.
» vulgatus (Flügge).

Streptothrix:

Streptothrix alba (fluidificans).
» albida.
» citrea.

Blastomiceti:

Saccharomyces albus.
Hefe-rosa.
Hefe-nigra.

Ifomiceti:

Aspergillus niger.
Mucor mucedo.
Penicillium glaucum.
Thamnidium elegans.

Specie batteriche isolate nell'agosto e settembre 1901

Streptothrix alba fluidificans.
» albida.
Hefe-rosa.
Hefe-nigra.
Saccaromyces albus.
Mucor mucedo.
Thamnidium elegans.
Penicillium glaucum.

Specie batteriche isolate nel dicembre 1901

Bacillus giallo–limone.
» flavocoriaceus
» mycoides.
» subtilis.
» verde-giallo di Lustig.
» vulgatus (Flügge).
Streptothrix albida.
» citrea.
Hefe-rosa.
Saccharomyces albus.
Aspergillus niger.
Mucor mucedo.
Penicillium glaucum.

Elenco generale delle specie batteriche isolate alle sorgenti e all'inizio dell'acquedotto nuovo dell'acqua Marcia.

Cocchi:

Micrococcus aquatilis.
» aurantiacus.
» candicans.
» cerasinus (List).
» citreus liquefaciens.
» citreus di Miquel.
» flavus desidens.
» flavus tardigradus.
» luteus.
» versicolor.

Sarcina alba (Zimmermann).
» alutacea (Gruber).
» citrina (Gruber).
» incarnata (Gruber).
» lutea (Schröter).
» meliflava (Gruber).
» pulchra Henrici.
» rosea (Schröter).
» erythromyxa (Král).

Batteri:

Bacterium album.
» aurantiacum.
» aurescens di Frankland.
» coeruleum (Smith).
» cremoides.
» fluorescens liquefaciens.
» fluorescens non liquefaciens.
» nubilum.
» luteum (List).
» rubrum (Migula).
» violaceum.
» viscosum.
» vulgare.

Bacilli:

Bacillus aquatilis.
» albus.
» cyaneo-fuscus di Beyerinck.
» dendriticus.
» luteus (giallo di Lustig).
» luteus (giallo limone di Lustig).
» flavocoriaceus.
» mycoides.
» subtilis.
» verde-giallo di Lustig.
» vulgatus (Flügge).

Streptothrix-Leptothrix, etc.:

Streptothrix albida.
» alba fluidificans.
» citrea.

Blastomiceti e Oidii:

Saccharomyces albus.
Hefe-rosa.
Hefe-nigra.
Oïdium roseum.

Ifomiceti:

Aspergillus niger.
Cladosporium.
Mucor mucedo.
Penicillium glaucum.
Thamnidium elegans.

Dai precedenti elenchi risulta che dove le opere di presa sono più semplici ed hanno meno superficie libera in contatto coll'ambiente esterno, ivi si ha il minimo numero delle specie come già vedemmo che si ha il minimo numero totale dei batteri.

Vediamo altresì che *tutte le specie* che s'incontrano nelle varie sorgenti, non solo nell'acqua, ma comunque attaccate alla superficie interna delle opere di presa, si ritrovano, quasi diremo, *che si danno convegno all'unione delle sorgenti* cioè all'inizio dell'acquedotto.

In complesso vediamo che *ben 55 specie batteriche si possono trovare nell'acqua Marcia analizzata non solo nella sua sorgente, ma in ogni recesso delle opere di presa e dell'inizio dell'acquedotto.*

Non tutte però, come vedremo, arrivano d'ordinario in città.

Alcune difatti vennero rintracciate in punti che non arrivano mai in contatto coll'acqua che perviene a Roma. Ciò già poteva far supporre che *nell'acqua Marcia a Roma si rinviene minor numero di specie che non sulle pareti delle opere di presa delle sorgenti e all'inizio dell'acquedotto in muratura.*

Difatti non trovammo all'arrivo in città le seguenti 29 specie:

Micr. agilis.
» auranticus.
» cerasinus.
» citreus di Miquel.
» flavus desidens.
» » tardigradus.
» versicolor.
Sarcina alutacea.
» incarnata.
» meliflava.
» pulchra.
» erythromyxa.
Bacterium aurantiacum.
» cremoides.
» nubilum.
» rubrum.
Bacillus cyaneo-fuscus.
» dendriticus.
» luteus (giallo di Lustig).
» flavocoriaceus.
» verde-giallo di Lustig.
Streptothrix citrea.
Saccharomyces roseus.
» niger.

Oïdium roseum.
Aspergillus niger.
Cladosporium.
Mucor mucedo.
Thammidium elegans.

Abbiamo anche voluto determinare direttamente *quali specie di batteri sono più comuni nell'acqua che si distribuisce in città,* ed eccone l'elenco:

Cocchi:

Micrococcus candicans.
» citreus liquefaciens.
» luteus.
Sarcina alba.
» citrina.
» lutea.
» rosea.

Batteri:

Bacterium album.
» aurescens.
» coeruleum.
» fluorescens liquefaciens.
» fluorescens non liquefaciens.
» luteum.
» violaceum.
» viscosum.
» vulgare.

Bacilli:

Bacillus albus.
» aquatilis.
» luteus (giallo-limone di Lustig).
» mycoides.
» subtilis.
» vulgatus.

Streptothrix:

Streptothrix alba.
» albida.

Blastomiceti:

Saccharomyces albus.

Ifomiceti:

Aspergillus albus.
» glaucus.
Penicillium glaucum.

Sicchè delle 55 specie trovate sulle pareti alle sorgenti ed all'inizio dell'acquedotto in muratura appena una trentina ne arrivano di solito a Roma.

Anzi, più particolarmente, quelle che più di solito arrivano a Roma sono:

Micrococcus luteus.
Sarcina alba.
» citrina.
Bacterium coeruleum.
» fluorescens liquefaciens.
» fluorescens non liquefaciens.
» vulgare.
Bacillus mycoides.
» subtilis.
» vulgatus.
Streptothrix alba.
» albida.
Blastomycetes.
Penicillium glaucum.

Anche però contando tutte le specie elencate a pagina 792 si vede che alle 13 specie determinate nel 1892 da Sanfelice e Oreffice (1) si devono aggiungere altre 17 specie cioè:

Micrococcus candicans.
» citreus.
» luteus.
Sarcina citrina.
» rosea.
Bacterium album.
» aurescens.
» coeruleum.
» luteum.
» viscosum.
Bacillus albus.
» aquatilis.
» luteus.
Streptothrix albida.
Blastomycetes albus.

ai quali se ne devono aggiungere ancora due trovati nelle sabbie delle diramazioni terminali cioè:

Micr. aquatilis
Bact. aurescens

(1) Loc. cit.

e sottrarne due, il *proteus mirabilis* e il b. similtifo, la cui diagnosi però se è stata fatta dalla sola colonia, non può ritenersi esatta come diremo in seguito.

Per maggior precisione abbiamo anche voluto determinare la *specie dei batteri che si accumulano nei depositi di sabbie terroso-ferruginee terminali, nei robinetti misuratori e nei serbatoi delle case.*

Eccone l'elenco:

Sabbie delle diramazioni terminali e dei robinetti misuratori.

Cocchi:

Micrococcus aquatilis (Bolton).
» cerasinus.
» citreus.
» versicolor.

Sarcina citrina.
» pulchra.

Batteri:

Bacterium coeruleum.
» fluorescens liquefaciens.
» liquidum.
» viscosum.
» vulgare.

Bacilli:

Bacillus mycoides.
» vulgatus.

Streptothrix:

Streptothrix alba.
» incarnata.

Blastomiceti:

Blastomycetes albus.

Ifomiceti:

Aspergillus glaucus.
Penicillium glaucum.

Sabbie dei serbatoi (oltre alle soprascritte specie).

Cocchi:

Micrococcus candicans.

Batteri:

Bacterium luteum.
» violaceum.

Bacilli:

Bacillus albus
» aquatilis.

Ifomiceti:

Aspergillus albus.

Si vede adunque come *neanche nei depositi delle sabbie si rinvengono tutte le specie dei batteri che vivono comunque attaccati alle opere di presa e di condottura.*

Non è detto però che in circostanze eccezionali per un contatto diretto od indiretto colla corrente dell'acqua almeno alcune non possano con questa giungere in città.

I più comuni a trovarsi nei depositi suddetti, forse perchè vi trovano condizioni più favorevoli per moltiplicarsi o per resistere in vita sono ad ogni modo i seguenti:

Micrococcus aquatilis (Bolton).
Sarcina citrina.
Bacterium coeruleum.
» fluorescens liquefaciens.
» viscosum.
» vulgare.
Bacillus mycoides.
Streptothrix alba.
Blastomycetes albus.
Aspergillus glaucus.
Penicillium glaucum.

Diamo, in fine, l'elenco delle 55 precedenti specie batteriche, dovunque rinvenute, e le classifichiamo secondo il genere cui appartengono, e secondo alcune proprietà loro biologiche, se cioè sono cromogene o no, fluidificanti o non fludificanti.

	Cocchi	Batteri	Bacilli
Cromogeni	Micrococcus aquatilis (Cohen)	Bacterium aurantiacum	Bacillus aquatilis
	» aurantiacus	» aurescens di Frankland	» cyaneo-fuscus Beyerinck
	» cerasinus (List)	» coeruleum (Smith)	» giallo di Lustig
	» citreus liquefaciens	» cremoides	» giallo limone
	» citreus di Michel	» fluorescens liquefaciens	» flavocoriaceus
	» flavus desidens	» fluorescens non liquef.	» verde-giallo di Lustig
	» flavus tardigradus	» luteum (List)	» mycoides
	» luteus	» violaceum	
	» versicolor	» rubrum (Migula)	
	Sarcina citrina (Gruber)	» viscosum	
	» incarnata (Gruber)		
	» lutea Schröter		
	» meliflava (Gruber)		
	» rosea Schröter		
	» erythromyxa Král		
Non cromogeni	Micrococcus candicans	Bacterium album	Bacillus albus
	Sarcina alba Zimmermann		» dendriticus
	» alutacea (Gruber)		» mycoides
	» pulchra Henrici		» subtilis
			» vulgatus (Flügge)

ICIA ALLE SORGENTI.

Vibrioni	Streptothrix, Leptothrix, etc.	Blastomiceti e Oidii	Ifomiceti
	Streptothrix citrea	Hefe-rosa Hefe-nigre Oïdium roseum	Aspergillus niger Cladosporium Mucor mucedo Penicillium glaucum Thamnidium elegans
	Streptothrix albida » alba fluidificans	Saccharomyces albus	

	Cocchi	Batteri	Bacilli
Fluidificanti	Micrococcus aquatilis (Cohen)	Bacterium coeruleum (Smith)	Bacillus arborescens
	» citreus liquefaciens	» fluorescens liquefaciens	» cyaneo-fuscus Beyerink
	» flavus desidens	» album	» giallo di Lustig
	» luteus	» viscosum	» giallo-limone
	Sarcina alba Zimmermann	» vulgare	» mycoides
	» alutacea (Gruber)		» subtilis
	» rosea Schröter		» verde-giallo (Lustig)
			» vulgatus (Flügge)
Non fluidificanti	Micrococcus aurantiacus	Bacterium aurantiacum	Bacillus aquatilis
	» candicans	» aurescens di Frankland	» albus
	» cerasinus (List)	» cremoides	» flavocoriaceus
	» citreus di Miquel	» fluorescens non liquef.	
	» flavus tardigradus	» luteum (List)	
	» versicolor	» violaceum	
	Sarcina citrina (Gruber)	» album	
	» incarnata (Gruber)	» rubrum (Migula)	
	» lutea Schröter		
	» meliflava (Gruber)		
	» pulchra Henrici		
	» erythromyxa Král		

Vibrioni	Streptothrix, Leptothrix, etc.	Blastomiceti e Oidii	Ifomiceti
	Streptothrix alba fluidificans	Oïdium roseum	
	Streptothrix albida » citrea	Saccharomyces albus Hefe-rosa Hefe-nigra	

Nessuna delle specie isolate coi metodi di ricerca più comuni, si può dunque riportare a qualcuna delle patogene per l'uomo.

Per rintracciare il *b. coli*, che per alcuni è un normale abitatore delle acque, per altri è un segno di loro contaminazione, abbiamo proceduto a una serie di ricerche sistematiche, le quali ci hanno condotto a concludere che alle scaturigini dell'acqua Marcia, non si trovi nè il tipico *b. coli comune*, nè una qualsiasi forma del gruppo dei *colisimili.*

A questa conclusione siamo venuti dopo avere studiati i germi sviluppantisi nel brodo di Abba, non contentandoci soltanto di vedere se i brodi venivano decolorati, e vi si formava spuma, e poi di rilevare i caratteri macroscopici delle colonie, ma eziandio sottomettendo i germi isolati a un accurato studio morfologico e biologico in modo da stabilire la diagnosi della specie. Abbiamo così trovato che il brodo di Abba viene decolorato frequentemente, nel caso dell'acqua Marcia, dal *b. viscosum* e dal *micr. liquefaciens*, più raramente da altri germi, come dal *b. vulgare*, dal *b. mycoides* e da una forma dal punto di vista morfologico simile al tetano ma non patogena, che noi indichiamo col nome di *plectridium aquatile.*

Giova però notare che alcune volte, all'arrivo in città, si isolano delle forme gasogene, le quali per la forma, per il modo di comportarsi nel terreno di Drigalski, in quello di Rothberger, nel latte, nella gelatina lattosata e al tornasole, ricordano il b. coli.

Queste forme sono state da noi sottoposte ad un studio accurato per stabilirne la frequenza e le parentele col b. coli.

Quanto alla loro frequenza, per molto tempo non le trovammo giammai; poi le trovammo nel 20 per cento degli esami praticati entro il periodo di 2 mesi, nei quali non ha mai piovuto e non è avvenuta alcuna manifesta alterazione alle sorgenti reali ed alle scaturigini apparenti.

Quanto ai loro rapporti col *b. coli comune*, sarebbero da riportare ai seguenti due tipi, tenendo in conto i principali caratteri colturali e biologici :

I tipo.	*II tipo.*
1. Immobile.	1. Mobile.
2. Sviluppo, nei comuni terreni, meno rigoglioso di quello del *b. coli* comune.	2. Sviluppo rigoglioso nei comuni terreni, come quello del *b. coli* comune.
3. Produzione di gas in tutti i substrati.	3. Produzione di gas in tutti i substrati.
4. Arrossa il terreno di Drigalski.	4. Arrossa il terreno di Drigalski.
5. Dà fluorescenza nel terreno di Rothberger.	5. Dà fluorescenza nel terreno di Rothberger.
6. Coagula il latte.	6. Coagula il latte.
7. Produce indolo.	7. Non produce indolo.
8. È patogeno per le cavie (ascessi e peritonite).	8. Non è patogeno per le cavie.

Saggiando questi batteri col siero di animali inoculati con un tipico *b. coli*, nessuno di essi venne agglutinato, mentre il *b. coli* lo era nelle proporzioni di 1 a 100.

Ora questo fatto, messo in relazione con le diverse modalità di sviluppo presentate dai batteri stessi, ci conduce a ritenere *che nessuno dei germi gasogeni isolati dall'acqua Marcia, al suo arrivo in città, si possa riportare al tipico b. coli: si tratta evidentemente di colisimili.*

Anche il Sanfelice, del resto, aveva isolato un germe che indubbiamente era un colisimile (forse di quelli del secondo tipo) e che egli chiamò *similtifo,* perchè a quell'epoca il gruppo dei similtifi comprendeva tutti quei germi che avevano caratteri specialmente morfologici e colturali, intermedi tra b. del tifo e del colon: successivamente, soltanto, venne separato da esso il gruppo dei colisimili, i quali hanno i caratteri biologici principali del *b. coli* (coagulano il latte, producono indolo, producono gas), pur potendo mantenere caratteri morfologici e colturali simili a quelli del b. del tifo.

Analoghe ricerche sistematiche fatte a mezzo di quei procedimenti dei quali si parla a pag. 758-60 ci hanno condotto poi a escludere la presenza non solo del *b. del tifo* nell'acqua Marcia ovunque vennero prelevati i campioni, ma anche quella di tifosimili propriamente detti (non gasogeni, non coagulanti il latte, ecc.).

Così pure non siamo riusciti, neanche con i metodi di ricerca speciali di cui a pag. 760, a trovare dei *vibrioni.* Nei brodi *ad hoc* non abbiamo mai notato la formazione di pellicole, per quanto alcune volte il brodo venisse intorbidato. In questi casi, isolato il germe e sottopostolo ad un accurato studio morfologico e biologico, abbiamo

potuto diagnosticare uno dei germi della famiglia dei protei e più frequentemente degli altri il *b. liquefaciens*.

Tentammo è vero di assicurarci della inesistenza di vibrioni col metodo delle colture per diffusione nei liquidi, secondo il procedimento del Beyerinck, ma l'esistenza nell'acqua di altri germi non ci ha permesso in tali condizioni di ottenere colture da poter emettere un giudizio.

VI. — Conclusioni.

1. Le più pure acque potabili sorgive, quando vengano condotte, mostrano irregolari e talvolta assai ampie oscillazioni del numero dei batteri.

2. Queste oscillazioni batteriche sono troppo spesso considerate come l'indice di alterazione e perfino di corruzione delle sorgenti, quando anche non si mettono a dirittura in rapporto con epidemie di tifoide.

3. Invece le cause delle suddette oscillazioni batteriche sono da ricercare piuttosto nell'interno delle opere di presa e degli acquedotti.

4. Per provare quanto qui sopra, si presta bene lo studio batteriologico dell'acqua Marcia, metodicamente fatto dalle sorgenti agli ultimi rami della sua distribuzione.

5. Si deve premettere che:

a) l'acqua Marcia ha le sue origini reali in un altipiano appenninico, elevato dai 700 ai 1800 metri sul livello del mare, con estesissimi boschi e quasi mancanza di abitazioni;

b) il regime delle sorgenti non subisce alcuna variazione brusca in nessun periodo dell'anno; trattasi perciò di un fiume quasi costantemente perenne di acque sotterranee;

c) al piano delle scaturigini le acque sono raccolte con varie opere di presa, tutte ben fatte, ma eseguite coi diversi criteri predominanti, e ritenuti i migliori, nelle diverse epoche dal 1865 in poi;

d) le scaturigini sono ben difese con opere ingegnose e razionali non solo dalle acque di superficie (pioggie, inondazioni dell'Aniene), ma anche da infiltrazioni sotterranee del letto di questo fiume.

6. Or bene l'acqua Marcia scaturisce purissima, cioè con 0·10 batteri per cmc.

Una così scarsa flora batterica non cresce nè durante gli acquaz-

zoni torrenziali estivi sul bacino imbrifero, nè durante le pioggie autunnali e le inondazioni dell'Aniene, come nemmeno durante il disgelo delle nevi abbondanti sul bacino imbrifero suddetto.

7. Nella parete interna però delle murature, e, in genere delle *opere di presa*, nelle parti cioè che sono in comunicazione più o meno libera coll'ambiente esterno, si formano pellicole o vegetazioni batteriche: queste si riducono al minimo dove le opere di presa sono più moderne e più semplici, mentre crescono al massimo dove le opere di presa sono più antiche e più superflue, o dove si può accumulare al fondo la fina sabbia detritica delle roccie: le dette pellicole e sabbie distaccandosi, o, comunque, mescolandosi alla corrente ne accrescono la dotazione batterica, e questa può essere già una delle cause delle oscillazioni dei batteri nell'acqua, com'è la ragione per cui i batteri medesimi vi si trovano distribuiti non uniformemente e spesso a colonie o zooglee.

8. Le vegetazioni batteriche suddette sono assai rigogliose anche lungo la parete interna degli *acquedotti in muratura*, tantochè alla periferia si trovano di solito più batteri che al centro della corrente, e basta elevare il livello del pelo d'acqua per vedervi crescere in proporzione il numero dei batteri.

Questa può essere un'altra causa delle oscillazioni batteriche suddette. E un'altra causa simile, lungo gli acquedotti a pelo libero, può essere l'aspirazione di aria esterna, polverosa, come avviene negli sfiatatoi, nei sottopassaggi a sifone e così via.

9. Nelle *condutture di ghisa* o a pressione, la flora batterica non varia per solito neanche per un lungo percorso di 27 chilometri, ma dovunque si produce un arresto o punto morto della corrente, come presso le *saracinesche*, *i robinetti misuratori*, *i serbatoi*, ivi si accumula una sabbia dovuta in parte allo sgretolìo insensibile delle roccie interne delle sorgenti, in parte all'azione dei composti gazzosi dell'acqua sul ferro delle opere di presa e di condottura: questa sabbia è il luogo di arresto e forse anche di coltura dei batteri, per cui quando si viene a rimescolare coll'acqua non solo più o meno la intorbida, ma vi fa crescere il numero dei batteri.

Questi intorbidamenti, specie se avvengono in tempo di pioggia, fan nascere falsi allarmi di corruzione e inquinamento dell'acqua alle sorgenti e lungo gli acquedotti.

10. A parte queste ultime e le suddette cause accidentali delle oscillazioni batteriche, l'acqua Marcia si mantiene pura non solo nella città, ma eziandio nelle sue ultime diramazioni nel suburbio e nell'Agro Romano, puranche dopo il percorso di 88 chilometri, come a Fiumicino.

11. Dunque, le cause delle oscillazioni del numero dei batteri si devono ricercare nell'interno delle opere stesse di presa e di condottura dell'acqua Marcia, prima di immaginare od incolpare una corruzione delle sorgenti o lungo gli acquedotti.

12. Le oscillazioni del numero delle specie batteriche procedono per lo più d'accordo con le oscillazioni del numero totale dei batteri; e più o meno frequenti si rinvengono in tutto circa 55 specie innocue, e comuni a trovarsi nell'aria e nell'ambiente.

13. Dove le opere di presa sono più semplici ed hanno meno superficie libera in contatto con l'ambiente esterno, ivi si ha il minimo numero delle specie, come già vedemmo che si ha il minimo numero totale dei batteri.

14. Non tutte però le dette specie arrivano d'ordinario in città: difatti nell'acqua Marcia a Roma si rinvengono, di solito, non più di 12-15 specie, e quindi molto minor numero che non nelle pareti delle opere di presa delle sorgenti e degli acquedotti in muratura.

15. Infine, di tutte le specie batteriche ritrovate, comunque, alle sorgenti, negli acquedotti e in città, nessuna appartiene alle specie patogene per l'uomo, e in ispecie, non b. del colon, non b. del tifo, non vibrioni furono mai riscontrati, in qualsiasi punto dell'acqua Marcia; alle sue scaturigini mancano eziandio i colisimili, che talora si possono riscontrare nelle diramazioni terminali delle condotture.

VII. — Corollari pratici.

La ricca flora batterica che vedemmo vegetare così rigogliosamente addosso alle pareti interne delle opere di presa, di condottura e distribuzione dell'acqua Marcia, deve più o meno svilupparsi anche in altre acque similmente condotte.

Vorremmo perciò che gli uffici municipali di vigilanza igienica delle acque facessero ricerche analoghe alle nostre, specialmente là dove le oscillazioni batteriche nelle acque potabili destano dubbi di corruzione delle sorgenti e degli acquedotti.

Quando quest'ultimo sospetto si può, come per l'acqua Marcia, escludere, le dette oscillazioni batteriche non intaccano affatto i pregi di potabilità di un'acqua, e quindi sono per la nostra salute indifferenti al pari di tutti quei batteri medesimi, che aspiriamo dall'aria o introduciamo col cibo, o in qualsiasi altro modo.

Ma, per seguire ogni scrupolo, anche il più rigoroso si potrebbe giungere a desiderare che un'acqua sorgiva, la quale abbia la for-

tuna di scaturire batteriologicamente pura, arrivi tale, dopo un percorso più o meno lungo, in città e nelle case.

Questo è un'ideale igienico che si domanda e si raggiunge per le cosiddette acque da tavola, convenientemente imbottigliate.

Si può raggiungere eziandio per le acque condotte?

È ovvio che l'aria atmosferica e il suo polviscolo possono penetrare dentro una canalizzazione sotterranea.

Prima si lasciavano sempre i cosiddetti sfiatatoi, col pregiudizio di arieggiare l'acqua, che può così, invece che acquistare, piuttosto perdere i suoi componenti gazzosi, coi quali esce dalle viscere della terra; ma anche oggi, porte, chiusini e aperture in genere non mancano nemmeno nelle migliori opere di condotta d'acqua.

E parecchie sono le forze che trasportano l'aria dall'esterno all'interno.

Anzitutto la corrente stessa dell'acqua trascina la soprastante massa di aria degli acquedotti, e così vi richiama quella esterna. Ciò che avviene in maggior quantità, e certe volte con la forza come di vento impetuoso, appena si formi una caduta d'acqua o un sifonaggio.

Queste energie aspiranti agiscono a grandi distanze dentro gli acquedotti.

Anche gli sbalzi di temperatura possono agire aspirando, mediante gli squilibri che, fra l'interno e l'esterno, nelle varie ore del giorno e della notte avvengono o in sito, o a distanza fra un punto e l'altro, per esempio, fra due imbocchi di un medesimo tratto di acquedotto, diversamente esposti, o comunque aventi una temperatura diversa.

Si aggiunga che per comodità di costruzione, per necessità di pendenza, ordinariamente più o meno lunghi tratti di acquedotti e spesso le medesime opere di presa delle acque si costruiscono in vicinanza di strade, la cui polvere può così venire ad essere continuamente aspirata e trascinata nelle condotture delle acque potabili.

Si aggiunga altresì che l'uomo col suo corpo, col suo vestiario, coi suoi piedi, con gli istrumenti e i materiali da lavoro, può introdurre batteri negli acquedotti.

Quindi anche quando non si abbia a lamentare alcun difetto di costruzione, come fissure, soluzioni di continuità, porosità dei materiali o alcuna infiltrazione d'acqua o di terreno superficiale, possono per vie diverse e per diverse forze i batteri dell'ambiente penetrare in una condottura. E, una volta penetrati, in ogni superficie interna,

umida, oscura, in contatto coll'aria, a temperatura favorevole, sopra il terreno nutritivo dei batteri morti, possono rigogliosamente vegetare, e perciò si vedono pareti o superficie vischiose, di vario colorito, e raschiandole si raccolgono spesso abbondanti pellicole, e le goccie che, aprendo le comunicazioni coll'esterno, o altrimenti cadono, come pioggia, dalla vôlta, o scorrono lungo le pareti sono talora sporche, per materie che trascinano e trattengono in sospensione.

Un altro luogo di arresto, e forse di coltura dei batteri, comunque penetrati negli acquedotti, sono le sabbie. Queste non si possono neppure evitare, sia quando sono il detrito impalpabile delle roccie interne delle sorgenti, sia quando provengono dall'azione dei composti solidi dell'acqua, o sulle murature, o, specialmente, sui materiali di ferro.

Con tutto ciò appare subito non facile, e forse impossibile impresa conservare batteriologicamente pura un'acqua condotta per un lungo tragitto.

Possiamo però tentare di suggerire qualche provvedimento, come *corollario delle nostre ricerche sull'acqua Marcia.*

Nelle opere di presa si escluda ogni monumentalità, e si limiti al minimo possibile ogni costruzione superflua, come grandi vasche, mostre, ecc.: l'acqua si estragga dalla roccia o dal terreno, mediante drenaggi e da questi si faccia entrare subito nell'acquedotto: se occorre uno sfioratore, questo sia provvisto di ermetica chiusura idraulica: i bottini di ispezione siano ridotti al minimo, assolutamente necessario, e non facciano entrare se non l'aria filtrata attraverso a spessi filtri o di malta o di feltro e, in caso di apertura, siano provvisti di doppia porta con una cameretta intermedia: le pareti interne, quando non se ne possa fare a meno, sieno spesso imbiancate con latte di calce; le paratoie di ferro siano verniciate, o comunque rese inattaccabili dai componenti gassosi dell'acqua.

Gli *acquedotti a pelo libero* vengano sostituiti, più che è possibile, da acquedotti forzati, per esempio, di ghisa o di cemento armato in pressione, e qualsiasi bottino di comunicazione coll'esterno sia provvisto di filtri dell'aria, e di porta doppia, come sopra fu detto: gli sfiatatoi, quando siano indispensabili, vengano muniti, nell'apertura esterna, con valvola di mica, che si possa aprire solo per fare uscire l'aria interna, e si chiuda quando l'aria esterna entri.

Gli accumoli di sabbia nei *serbatoi* presso le *saracinesche* e i *rubinetti misuratori* si asportino con lavaggi periodici mediante la stessa acqua corrente.

Nella *distribuzione domestica* i tubi portatori arrivino direttamente dalla strada agli appartamenti, e i cassoni o serbatoi, quando non se ne possa fare a meno, siano, oltrechè ermeticamente chiusi, periodicamente spurgati dal deposito del fondo.

Tocca poi all'uomo di mantenersi in condizioni di asepsi, cioè di *massima pulizia*, (calzari, vestiario, mani lavate), quando penetri in un acquedotto: apra anzi il meno possibile i chiusini, e se c'è polvere nell'aria eviti di aprirli.

Cosicchè il problema di condurre a notevoli distanze un'acqua conservandola batteriologicamente pura, come alle sorgenti, non è impossibile a risolversi.

Certo, quando si debba costruire una condottura nuova, si potrebbero facilmente adottare molti, almeno, dei suggerimenti sopraddetti: ma eziandio le condotture che sono già ben fatte si potrebbero con qualche perfezionamento porre in grado da ridurre al minimo le invasioni e le oscillazioni batteriche, ed è ciò che si sta facendo e sempre più si dovrà fare per l'acqua Marcia, perchè mantenga il vanto di essere condotta secondo le ultime e più perfette norme d'igiene.

TABELLE

TABELLA 1. — *Prima Serena.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo
1901			
23 agosto.	Tra i 5 e i 30 centim. dal pelo dell'acqua	11	
24 »	» »	0	
24 »	» »	0	
24 »	» »	8	
25 »	» »	2	
25 »	» »	2	
26 »	» »	2	
26 »	» »	60	
27 »	» »	6	
28 »	» »	6	
29 »	» »	8	
30 »	» »	3	
31 »	» »	1	
1 settembre	» »	2	
2 »	» »	2	
3 »	» »	1	
4 »	» »	4	7
4 »	Parete	35	
4 »	Fondo	11	

TABELLA 2. — *Seconda Serena.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
1901				
23 agosto . .	Uscita S	18		
23 » . .	»	23		
24 » . .	»	14		
24 » . .	»	Fl.		
24 » . .	»	53		
25 » . .	»	2		
25 » . .	»	4		
26 » . .	»	0		
26 » . .	»	29		
27 » . .	»	6		
28 » . .	»	32		
29 » . .	»	10		
30 » . .	»	Fl.		
31 » . .	»	16		
1 settembre.	»	11		
2 » .	»	0		
3 » .	»	0		
4 » .	»	7	Uscita S	12
23 agosto . .	Uscita Fondo	1		
23 » . .	»	26		
30 » . .	»	2		
31 » . .	»	Fl.		
4 settembre.	»	59	Uscita F	18
30 agosto . .	1° Drenaggio S	9		
31 » . .	»	1	1° Drenaggio S	5
29 » . .	2° Drenaggio S	8		
30 » . .	»	8	2° Drenaggio S	8

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
1901				
30 agosto . .	3° Drenaggio S	3		
31 » . .	»	0		
4 settembre.	»	2258 simili	3° Drenaggio S	2
29 agosto . .	1° Drenaggio P	6	1° Drenaggio P	6
29 » . .	2° Drenaggio P	12	2° Drenaggio P	12
29 » . .	3° Drenaggio P	9	3° Drenaggio P	9
30 » . .	1° Drenaggio F	6		
31 » . .	»	Fl.	1° Drenaggio F	4
30 » . .	2° Drenaggio F	Fl.	2° Drenaggio F	1
30 » . .	3° Drenaggio F	Fl.		
31 » . .	»	29		
4 settembre.	»	15	3° Drenaggio F	15
4 » .	Uscita. Pareti sotto	9652		

Tabella 3. — *Galleria di S. Lucia.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
23 agosto . .	Centro S	5				
23 » . .	»	6				
23 » . .	»	3				
24 » . .	»	4				
24 » . .	»	0				
24 » . .	»	2				
25 » . .	»	0				

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
25 agosto . .	Centro S	0				
26 » . .	»	0				
27 » . .	»	10				
28 » . .	»	4				
28 » . .	»	4				
30 » . .	»	2				
31 » . .	»	0				
1 settembre.	»	3				
2 » .	»	0				
3 » .	»	0				
4 » .	»	11	..	..	Centro S	3
29 agosto . .	Centro F	8				
30 » . .	»	8				
4 settembre.	»	35	..	..	Centro F	17
30 agosto . .	Parete S	5				
31 » . .	»	3	..	..	Parete S	4
23 » . .	..	..	Raschiat. sopra	0		
23 » . .	..	..	»	8		
23 » . .	..	..	»	3		
29 » . .	..	..	»	1	Raschiat. sopra	3
23 » . .	..	..	Raschiat. sotto	1		
23 » . .	...	..	»	13		
23 » . .	..	..	»	3		
29 » . .	..	..	»	4		
4 settembre.	..	..	»	22	Raschiat. sotto	5

TABELLA 4. — *Prima Serena.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
19 dicembre .	S	3				
20 » .	»	9				
21 » .	»	3				
22 » .	»	10				
22 » .	»	1	..	..	S	5
22 » .	F	18	..	..	F	18
22 » .	Parete (batuffolo)	21	..	..	Parete (batuffolo)	21

TABELLA 5. — *Seconda Serena.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
19 dicembre .	Uscita S	1				
20 » .	»	3				
21 » .	»	0				
21 » .	»	2				
22 » .	»	7				
22 » .	»	12	..	..	Uscita S	4
19 » .	Uscita F	1	..	..	Uscita F	1
22 » .	1° Drenaggio	61	..	..	1° Drenaggio	61
22 » .	2° Drenaggio	14	..	..	2° Drenaggio	14
22 » .	3° Drenaggio	26	..	...	3° Drenaggio	26

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
19 dicembre .	Sabbia	80				
20 » .	»	100				
21 » .	»	220				
22 » .	»	1,276				
22 » .	»	1,456	..	..	Sabbia	626
22 » .	Raschiatura parete	7,552	..	..	Raschiatura parete	7,552
22 » .	Stillicidio volta	1 620				
22 » .	»	940				
22 » .	»	3,740	..	..	Stillicidio volta	2,100
22 » .	Stillicidio ballatoio	Fluid.				
22 » .	»	151,200	..	..	Stillicidio ballatoio	151,200
22 » .	Stillicidio sotto	18,360	..	..	Stillicidio sotto	18,360

TABELLA 6. — *Terza Serena.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
19 dicembre .	Centro S	5				
19 » .	»	5				
20 » .	»	10				
20 » .	»	13				
21 » .	»	2				
22 » .	»	6	..	..	Centro S	7

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901.						
20 dicembre .	Parete S	6				
20 » .	»	Patina				
21 » .	»	2				
22 » .	»	1	. .	. .	Parete S	3
19 » .	. .	. .	Pellicola sopra	80		
20 » .	. .	. .	»	0		
20 » .	. .	. .	»	0		
21 » .	. .	. .	»	10		
21 » .	. .	. .	»	420		
22 » .	. .	. .	»	60	Pellicola sopra	95
19 » .	. .	. .	Pellicola sotto	170		
20 » .	. .	. .	»	590		
20 » .	. .	. .	»	Pat.+10		
21 » .	. .	. .	»	340		
21 » .	. .	. .	»	530		
22 » .	. .	. .	»	320		
22 » .	. .	. .	»	380	Pellicola sotto	336

TABELLA 7. — *Quarta Serena.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
19 dicembre .	Centro S	35				
19 » .	»	39				
19 » .	»	25				
20 » .	»	33				

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
20 dicembre .	Centro S	37				
21 »	»	27				
22 » .	»	41	. .	. .	Centro S	34
20 » .	Parete S	23				
20 » .	»	46				
21 » .	»	58				
22 » .	»	19				
22 » .	Fondo	4	. .	. .	Parete S	37
19 » .	. .	. .	Pellicola sopra	410	Fondo	4
19 » .	. .	. .	»	2,360		
20 » .	. .	. .	»	1,150		
20 » .	. .	. .	»	1,170		
21 »	. .	. .	»	810		
21 » .	. .	. .	»	1,270		
22 » .	. .	. .	»	1,180		
22 » .	. .	. .	»	2,150	Pellicola sopra	1,386
19 » .	. .	. .	Pellicola sotto	250		
19 » .	. .	. .	»	540		
20 » .	. .	. .	»	210		
20 » .	. .	. .	»	650		
21 » .	. .	. .	»	370		
21 » .	. .	. .	»	460	Pellicola sotto	413

TABELLA 8. — *Galleria di S. Lucia.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
19 dicembre .	Centro S	0				
20 » .	» »	1				
21 » .	» »	3				
22 » .	» »	Fluid.				
22 » .	» »	1	..	..	Centro S	1
22 » .	Centro F	106	..	..	Centro F	106
19 » .	Parete S	0				
20 » .	» »	1				
21 » .	» »	0				
22 » .	» »	1				
22 » .	» »	2	..	..	Parete S	1
19 » .	.	..	Pellic. sopra	22,940		
20 » .	..	..	» »	20,720		
21 » .	..	..	» »	8,400		
22 » .	..	..	» »	2,688		
22 » .	..	..	» »	574		
22 » .	..	..	» »	16,800	Pellicola sopra	12,020
19 » .	..	..	Pellic. sotto	230		
20 » .	..	..	» »	240		
21 » .	..	..	» »	910		
22 » .	..	..	» »	430	Pellicola sotto	452
22 » .	..	..	Stillicidio	Fluid.		
22 » .	..	..	»	∞	Stillicidio	∞
22 » .	..	..	Vôlta	126	Vôlta	126

TABELLA 9. — *Prima Serena.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
1902				
26 aprile . .	Tra i 5 e i 30 centim. dal pelo dell'acqua	9		
26 » . .	» »	10		
26 » . .	» »	20		
26 » . .	» »	38		
26 » . .	» »	13		
26 » . .	» »	0		
26 » . .	» »	9		
26 » . .	» »	5		
26 » . .	» »	2		
26 » . .	» »	12		
26 » . .	» »	10		
27 » . .	» »	11		
27 » . .	» »	13		
27 » . .	» »	8		
27 » . .	» »	6		
27 » . .	» »	8		
27 » . .	» »	9		
27 » . .	» »	12	Tra i 5 e i 30 centim. dal pelo dell'acqua	11

TABELLA 10. — *Seconda Serena.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
1902				
26 aprile . .	Uscita	3		
26 » . .	»	11		
26 » . .	»	1		
26 » . .	»	6		
26 » . .	»	8		
26 » . .	»	1		
26 » . .	»	24		
26 » . .	»	34		
26 » . .	»	7		
26 » . .	»	22		
27 » . .	»	4		
27 » . .	»	6		
27 » . .	»	7		
27 » . .	»	8		
27 » . .	»	22		
27 » . .	»	17		
27 » . .	»	4		
27 » . .	»	2		
27 » . .	»	8	Uscita	10

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
1902				
26 aprile . .	1° Drenaggio	21		
26 » . .	»	24		
26 » . .	»	56		
26 » . .	»	21	1° Drenaggio	30
26 » . .	2° Drenaggio	74		
26 » . .	»	91		
26 » . .	»	22		
26 » . .	»	25	2° Drenaggio	53
26 » . .	3° Drenaggio	12		
26 » . .	»	7		
26 » . .	»	8		
26 » . .	»	11	3° Drenaggio	9
27 » . .	Sabbia del fondo	4,780	Sabbia del fondo	4,780

TABELLA 11. — *Galleria di Santa Lucia.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
1902				
26 aprile . .	Centro della corrente (tra i 5 e i 30 cm. dal pelo dell'acqua)	6		
26 » . .	»	9		
26 » . .	»	6		
26 » . .	»	8		
26 » . .	»	8		
26 » . .	»	5		
26 » . .	»	4		
26 » . .	»	6		
26 » . .	»	46 simili		
26 » . .	»	3		
27 » . .	»	7		
27 » . .	»	6		
27 » . .	»	9		
27 » . .	»	5		
27 » . .	»	2		
27 » . .	»	17		
27 » . .	»	10		
27 » . .	»	21		
27 » . .	»	7	Centro della corrente (tra i 5 e i 30 cm. dal pelo dell'acqua)	10

TABELLA 12. — *Medie dei batteri riscontrati per 1 cmc. d'acqua delle sorgenti.*

LOCALITÀ	Periodi di osservazione	Numero dei batteri	Media generale	Pellicole sopra corrente	Pellicole sotto corrente	Fondo	Stillicidio dalla vòlta	Sabbia	Raschiatura pareti
Prima Serena	1° periodo	7	8	..	..	11	..	..	.
	2° periodo	5		..	..	19	..	..	..
	3° periodo	11		..	..	...	..	..	..
Seconda Serena	1° periodo	8	18	..	..	10	.	..	..
	2° periodo	26		..	..	1	57,220	626	7,552
	3° periodo	21		..	..	..	..	..	..
Terza Serena	2° periodo		5	95	336	..	..	..	..
Quarta Serena	2° periodo		35	1,136	413	4	..	..	..
Galleria di S. Lucia	1° periodo	8	6	3	5	..	..	..	..
	2° periodo	1		12,020	452	106	126 a ∞	..	..
	3° periodo	10		..	..	..	..	..	..

TABELLA 13. — *Acquedotti in muratura.*

DATA	Luogo di presa del campione	Numero delle colonie fondenti	Numero delle colonie non fondenti	Numero totale dei batteri per cmc.
2 gennaio 1900	Acquedotto vecchio (inizio). . . .	6	4	10
	Acquedotto vecchio (mezzo) . . .	21	26	47
	Acquedotto vecchio (spiaggia). . .	5	7	12
	Acquedotto nuovo (inizio)	5	4	9
	Acquedotto nuovo (spiaggia) . . .	6	5	11
	Acquedotto nuovo Frattocce . . .	11	11	22
	Acquedotto nuovo Stazione di Tivoli	5	2	7

TABELLA 14. — *Acquedotti in muratura.*

DATA	Luogo di presa del campione	Numero delle colonie fondenti	Numero delle colonie non fondenti	Numero totale dei batteri per cmc.
22 marzo 1900	Acquedotto nuovo (inizio)	0	0	0
	Acquedotto nuovo (spiaggia) . . .	6	32	38
	Acquedotto nuovo (Stazione di Tivoli).	2	5	7

TABELLA 15. — *Pellicole degli Acquedotti.*

DATA	Luogo di presa del campione	Numero totale dei batteri contenuti in ½ cmc.	Numero totale dei batteri contenuti in $^1/_{10}$ di cmc.
24 maggio 1901	Acquedotto nuovo (inizio). (Poca pellicola, circa mezzo grammo. Si fa emulsione in 50 cmc. di acqua distillata sterilizzata e si agita ripetutamente).	∞	81,700
	Acquedotto vecchio (1° Trombino). (Molta pellicola, circa un grammo, in 50 cmc. di acqua distillata sterilizzata. Si fa emulsione in acqua dell'acquedotto. Si agita e poi si fa coltura).	∞	96,900

TABELLA 16. — *Distribuzione dei batteri in due campioni d'acqua.*

	Numero dei batteri		Numero dei batteri
Centro della corrente S . .	Pt. + 1	Pareti S	19
» » . .	Pt. + 1	»	4
» » . .	1	»	38
» » . .	Pt. + 3	»	69
» » . .	3	»	71
» » . .	111	»	Pt. + 33
» » . .	Pt. + 91	»	50
» » . .	15	»	Pt. + 47
» » . .	18	»	79
» » . .	9	»	48
» » . .	21	»	116
» » . .	110	»	45
» » . .	71	»	Pt. + 7
» » . .	94	»	31
» » . .	Pt. + 38	»	33
» » . .	Pt. + 7	»	Pt. + 88
» » . .	56	»	122
» » . .	9	»	81
» » . .	Pt. + 11	»	198
» » . .	15	»	Pt. + 18
» » . .	12	»	67
» » . .	Pt. + 21	»	93
» » . .	39	»	27
» » . .	13	»	112
» » . .	Pt. + 4	»	49
Media: Centro S	31	Media: Pareti S	62

Media generale per cmc. = 46 batteri.

NB. Pt = patina; S = superficie.

Tabella 17. — *Acquedotto nuovo (inizio).*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
23 agosto . .	Centro S	0				
23 » . .	»	1				
23 » . .	»	352 simili				
23 » . .	»	17				
23 » . .	»	2				
23 » . .	»	2				
24 » . .	»	2				
24 » . .	»	10				
25 » . .	»	2				
25 » . .	»	2				
26 » . .	»	0				
26 » . .	»	28				
27 » . .	»	3				
30 » . .	»	3				
28 » . .	»	1				
31 » . .	»	Fl.				
1 settembre .	»	5				
2 » .	»	2				
3 » .	»	0				
4 » .	»	Pt. + 1				
4 » .	»	Pt. + 1				
4 » .	»	Pt. + 33				
4 » .	»	Pt. + 8				
5 » .	»	13	. .	. .	Centro S	6

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
30 agosto . .	Parete S	15				
31 » . .	»	5				
4 settembre .	»	Pt. + 5				
4 » .	»	9				
4 » .	»	Pt. + 3				
5 » .	»	15	. .	. .	Parete S	9
30 agosto . .	Tra centro e parete S	3				
31 » . .	»	Fl.				
5 settembre .	»	16	. .	. .	Tra centro e parete S	7
23 agosto . .	Centro P	0				
23 » . .	» P	31				
29 » . .	» P 25 cm.	14				
29 » . .	» P 40 cm.	38				
30 agosto . .	» P	Fl.				
31 » . .	» P	2				
4 settembre .	» P	Pt. + 26				
5 » .	» P	9	. .	. .	Centro P	15
29 agosto . .	Parete P 20 cm.	2				
29 » . .	» P 35 cm.	14				
30 » . .	» P	Fl.				
31 » . .	» P	3				
4 settembre .	» P	97				
5 » .	» P	28	. .	. .	Parete P	24

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
29 agosto . .	Tra C e P-P 35 cm.	4				
30 » . .	»	116	. .	. .	Tra centro e parete P	60
5 settembre .	»	. .				
29 agosto . .	Centro F	12				
30 » . .	»	Fl.				
31 » . .	»	5				
4 settembre .	»	Pt.+1				
5 » .	»	37	. .	. .	Centro F	11
30 agosto . .	Parete F	11				
4 settembre .	»	Pt.				
5 » .	»	43	. .	. .	Parete F	18
29 agosto . .	Tra C e P-F	8				
30 » . .	»	1	. .	. .	Tra centro e parete F	5
23 » . .	. .	. .	Pellicola sopra	352,000		
23 » . .	. .	. .	»	5,000		
4 settembre .	. .	. .	»	Pt. 1,350	Pellicola sopra	119,450
23 agosto . .	. .	. .	Pellicola sotto	2,000		
23 » . .	. .	. .	»	27,000		
4 settembre .	. .	. .	»	Pt.+345	Pellicola sotto	9,781
4 » .	Vôlta	. .	Vôlta	29,760		

TABELLA 18. — *Acquedotto nuovo* (*inizio*).

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Pellicole	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
					Luogo di presa	Numero dei batteri
1901						
19 dicembre .	Centro S	5				
20 » .	»	4				
21 » .	»	1	. .	. .	Centro S	3
19 » .	Centro F	81	. .	. .	Centro F	81
19 » .	Parete S	1				
20 » .	»	6				
20 » .	»	Fluid.				
21 » .	»	3	. .	. .	Parete S	3
19 » .	. .	. .	Pellicola sopra	24,300		
20 » .	. .	. .	»	4,760	Pellicola sopra	14,530
19 » .	. .	. .	Pellicola sotto	180		
21 » .	. .	. .	»	Fluid.	Pellicola sotto	95
19 » .	. .	. .	Pellicola vôlta	126,600		
20 » .	. .	. .	»	4,200	Pellicola vôlta	65,400

Tabella 19. — *Acquedotto nuovo (inizio).*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo
1902			
26 aprile	Centro della corrente (tra i 5 e i 30 cm. dal pelo dell'acqua).	14	
26 »	»	11	
26 »	»	8	
26 »	»	3	
26 »	»	3	
26 »	»	16	
26 »	»	36	
26 »	»	3	
26 »	»	24	
26 »	»	2	
26 »	»	27	
26 »	»	2	
27 »	»	17	
27 »	»	7	
27 »	»	9	
27 »	»	13	
27 »	»	8	
27 »	»	7	
27 »	»	3	
27 »	»	4	
27 »	»	10	
27 »	»	6	
27 »	»	16	
27 »	»	20	
27 »	»	0	
27 »	»	1	10

TABELLA 20.

LOCALITÀ	Periodi di osservazione	Numero dei batteri	Media generale	Pellicole		Fondo	Stillicidio della vôlta
				sopra corrente	sotto corrente		
Acquedotto nuovo (inizio)	Primo periodo	20		119,450	9,781	11	..
	Secondo periodo	3	11	14,530	95	81	654,000
	Terzo periodo	10		..	..	..	..

TABELLA 21. — *Acquedotto nuovo (inizio).* — *Mutamento di livello.*

Prima dello innalzamento	Numero dei batteri	Innalzamento	Numero dei batteri	Abbassamento	Numero dei batteri	Mattina dopo (5 settembre 1901)	Numero dei batteri
Centro S	Pt. + 1	½ cm. Centro S	13	1 cm. Centro S	Pt. + 19	Centro S	13
» »	» 1	» » »	Pt. + 65	» » P	» 150	» P	9
» »	» 33	» Parete S	» 7	» » F	» 23	» F	37
Pareti S	» 5	» » »	» 11	» Parete P	» 12	Parete S	15
» »	9	» » »	» 6	» Centro S	» 120	» P	28
» »	Pt + 3	» » »	9	» » F	» 10	» F	43
Centro P	» 26	» » »	Pt. + 41			Tra C e P	16
Pareti »	97	» tra C e P »	» 151				
Centro F	Pt. + 1	» Centro P	54				
Pareti »	Pt.	» » »	Pt + 123				
		» » »	» 83				
		1 cm. Parte P	» 552				
		» » »	» 26				
		» » »	» 116				
		» Centro F	» 2				
		» Parete »	» 43				
		» Centro S	35				
		2½ cm. Centro S	Pt. + 6				
		» » P	» 900				
		» » F	» 100				
		» Parete S	» 8				
		» » P	» 17				
		» » F	5				
		» tra C e P	» 113				
Media per cmc.	18	½ cm. Media per cmc.	79	Media per cmc.	56	Media per cmc.	21
		2½ cm. Media per cmc.	165				

TABELLA 22. — *Acquedotto nuovo (inizio).* — *Mutamento di livello.*

Luogo di presa	Mutamento di livello	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
			Innalzamento:	
Centro S	Innalzamento 1 cm.	500	. .	. .
» S	» 1 »	287	1 cent. Centro S	393
» F	» 1 »	754	. .	. .
» F	» 1 »	962	1 cent. Centro F	858
Parete S	» 1 »	962	1 » Parete S	692
Tra C e P . . .	» 1 »	692	1 » Tra C e P	125
Centro S	» 1½ »	81	. .	. .
» S	» 1½ »	22	1½ cent. Centro S	51
» F	» 1½ »	6,570	. .	. .
Parete S	» 1½ »	93	1½ cent. Centro F	6,570
» S	» 1½ »	476	1½ » Parete S	284
» F	» 1½ »	11,276	1½ » » F	11,276
» (torbida) .	» 1½ »	244	. .	. .
Tra C e P . . .	» 1½ »	74	1½ cent. Tra C e P	74
Centro S	» 3½ »	8	3½ » Centro S	8
» F	» 3½ »	18,184	3½ » » F	18,184
Parete S	» 3½ »	Pt.ne + 42	3½ » Parete S	42
» F	» 3½ »	3,456	3½ » » F	3,456
Centro S	» 4½ »	Pt.ne + 52	4½ » Centro S	52
» P	» 4½ »	59	4½ » » P	59
» F	» 4½ »	7,344	4½ » » F	7,344
Parete S	» 4½ »	Fluid.	4½ » Parete S	Fluid.
» F	» 4½ »	3,312	4½ » » F	3,312

Luogo di presa	Mutamento di livello	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
Tra C e P-S . .	Innalzamento 4½ cm.	4,596	4½ » Tra C e P-S	2,311
» » » . .	» 4½ »	27	. .	. .
Centro S	» 5 »	32	5 cent. Centro S	32
Parete S	» 5 »	60	. .	. .
» S	» 5 »	2 Patine	5 cent. Parete S	31
Tra C e P-S . .	» 5 »	58	5 » Tra C e P-S	58
Centro S	» 7 »	49	7 » Centro S	49
Parete S	» 7 »	37	7 » Parete S	37
Tra C e P-S . .	» 7 »	71	7 » Tra C e P-S	71
			Abbassamento: (a)	
Centro S	Abbassamento	9	Centro S	9
» F	»	2,887	» F	2,887
Parete S	»	27	Parete S	27
Tra C e P-S . .	»	16	Tra C e P-S	16

(a) I campioni, nell'abbassamento di livello, furono presi quando il livello si mantenne costante per mezz'ora, ciò che avvenne dopo essersi abbassato di 3 centimetri dall'ultimo innalzamento.

TABELLA 23. — *Acquedotto nuovo* (*inizio*). — *Mutamento di livello.*

STADI dell'esperimento	Numero dei campioni (*a*)	Numero dei batteri contenuti in ciascun campione	Media dei batteri per centimetro cubo nei vari stadi di esperimento
Stazionario	1	8	
	1	6	
	1	3	
	2	11	
	2	15	
	2	9	
	3	11	
	3	8	
	3	19	
	4	1	
	4	1	
	4	1	
	5	13	
	5	17	
	5	1	
	6	1	
	6	8	
	6	13	Stazionario: 8

(*a*) Tutti i campioni vennero prelevati al centro della corrente dell'Acquedotto, e ad una profondità di circa centimetri 15 dal pelo dell'acqua.

STADI dell'esperimento	Numero dei campioni	Numero dei batteri contenuti in ciascun campione	Media dei batteri per centimetro cubo nei vari stadi di esperimento
	7	452	
Aumento progressivo.	7	849	
	7	726	
	8	37	
	8	25	
	8	6	
	9	64	
	9	89	
	9	132	
	10	9	
	10	12	
	10	3	
	11	57	
	11	34	
	11	48	
	12	6	
	12	8	
	12	.11	Aumento progressivo: 143

STADI dell'esperimento	Numero dei campioni	Numero dei batteri contenuti in ciascun campione	Media dei batteri per centimetro cubo nei vari stadi di esperimento
Acme	13	7	
	13	21	
	13	13	
	14	1	
	14	16	
	14	11	Acme : 12
Diminuzione progressiva.	15	29	
	15	12	
	15	2	
	16	4	
	16	47	
	16	16	Diminuzione progressiva : 18
Come all'inizio. . . .	17	6	
	17	2	
	17	5	
	18	14	
	18	9	
	18	18	Come all'inizio : 9

TABELLA 24. — *Serbatoio dell'Istituto d'igiene. — Analisi batteriologica in rapporto al mutamento di livello nell'Acquedotto nuovo (inizio)(12 luglio 1902).*

DATA	Ora	Numero dei batteri contenuti in ciascun campione (a)	Media dei batteri per centimetro cubo
1902			
12 luglio	20. 30	16	
12 »	20.30	23	
12 »	20. 30	21	12 luglio – ore 20,30 – n. 20
13 »	6. 30	23	
13 »	6. 30	47	
13 »	6. 30	39	13 luglio – ore 6,30 – n. 36
13 »	7. 30	23	
13 »	7. 30	65	
13 »	7 30	21	13 luglio – ore 7,30 – n. 36
13 »	8. 30	41	
13 »	8. 30	27	
13 »	8. 30	55	13 luglio – ore 8,30 – n. 41

(a) Tutti i campioni vennero prelevati dalla bocchetta d'arrivo dell'acqua nel serbatoio.

TABELLA 25. — *Acquedotto nuovo (inizio).* — *Vento polveroso.*

Prima del vento polveroso	Numero dei batteri	Durante il vento polveroso	Numero dei batteri	Due ore dopo del vento polveroso	Numero dei batteri	Un giorno dopo il vento polveroso (5 settembre)	Numero dei batteri
Centro S. . .	Pt. + 1	Centro S. . .	12	Centro S. . .	32	Centro S. . .	13
» . . .	Pt. + 1	» . . .	13	» . . .	9	. .	. .
» . . .	Pt. + 33	» . . .	37	» . . .	Pt. + 1	. .	. .
Pareti S. . .	Pt. + 5	Pareti S. . .	15	Pareti S. . .	6	Pareti S. . .	15
» . . .	9	» . . .	81	» . . .	23	. .	. .
» . . .	Pt. + 3	» . . .	49	» . . .	17	. .	. .
Centro P. . .	26	Centro P. . .	Pt. + 76	Centro P. . .	45	Centro P. . .	9
Pareti P. . .	97	Pareti P. . .	152	Pareti P. . .	64	Pareti P. . .	28
Centro F. . .	Pt. + 1	Centro F. . .	61	Centro F. . .	35	Centro F. . .	43
Pareti F. . .	Patine	Pareti F. . .	Pt. + 40	Pareti F. . .	Pt. + 27	Pareti F. . .	37
		Tra C e P-S	Pt. + 178	Tra C e P-S	59		
		Tra C e P-P	46	Tra C e P-P	17		
		Tra C e P-F	15	Tra C e P-F	11		
Media per cmc.	18	Media per cmc.	59	Media per cmc.	27	Media per cmc.	21

TABELLA 26.

DATA	Luogo di presa del campione	Numero delle colonie		Numero totale dei batteri per centimetro cubo
		Fondenti	Non fondenti	
22 marzo 1900	Acquedotto nuovo (origini)	0	0	0
	» » (spiaggia)	6	32	38
	» » stazione di Tivoli.	2	5	7
	Serbatoio di Quintiliolo.	2	6	8
	1° Sifone (Porta Pia)	1	2	3
	2° » (Campo Verano).	3	2	5
	3° » (Piazza Regina).	4	4	8

TABELLA 27.

DATA	Luogo di presa del campione	Numero delle colonie		Numero totale dei batteri per centimetro cubo
		Fondenti	Non fondenti	
1° febbraio 1900	Serbatoio di Quintiliolo.	40	9	49
	1° Sifone (fuori Porta Pia - S. Patrizio)	61	29	90
	2° » (di rimpetto a Campo Verano)	49	6	55
	3° » (Piazza Regina).	58	10	68

TABELLA 28.

DATA	Luogo di presa del campione	Numero delle colonie: Fondenti	Numero delle colonie: Non fondenti	Numero totale dei batteri per centimetro cubo
24 marzo 1900	Quintiliolo	40	9	49
	»	50	15	65
	1° Sifone (ingresso in città)	71	12	83
	2° » (» »)	52	14	66
	3° » (» »)	49	10	59
	Fontanella 1° Sifone (fuori Porta Pia)	39	14	53
	» 2° » (di rimpetto a Campo Verano)	55	10	65
	» 3° » (Piazza Regina)	48	20	68

TABELLA 29. — *Manovre delle saracinesche.*

DATA	Luogo di presa del campione	Numero delle colonie al 4° giorno dalla semina: Fondenti	Numero delle colonie al 4° giorno dalla semina: Non fondenti	Totale dei batteri	Media dei batteri per centim. cubo
22 giugno 1900	Fontana 3° Sifone (Piazza Regina)	0	0	0	0
	Via Cernaia (prima dell'apertura della saracinesca)	1	1	2	2
	Via Cernaia (dopo l'apertura della saracinesca)	27	476	503	503
	Via delle Grazie (prima dell'apertura della saracinesca)	12	27	39	39
	Via delle Grazie (dopo l'apertura della saracinesca - 1ª acqua molto torbida)	63	2,702	2,765	2,765
	Piazza Venezia (prima dell'apertura della saracinesca)	0	1	1	1
	Piazza Venezia (dopo l'apertura della saracinesca - 2ª acqua discretamente torbida)	13	67	80	80

TABELLA 30.

DATA	Luogo di presa del campione	Numero delle colonie al 3° giorno dalla semina		Totale dei batteri	Media dei batteri per centim. cubo
		Fondenti	Non fondenti		
30 giugno 1900	Ponte Margherita – 1ª acqua (temperat. 20° C)	4	11	15	15
	Ponte Margherita - 2ª acqua temperat. 20° C - acqua limpida)	5	20	25	25
	Via Ezio – 1ª acqua (temp. 12°. 5 C)	10	39	49	49
	Via Ezio - 2ª acqua molto torbida (temp. 11° C)	552	3,450	4,002	4,002
	Ponte S. Angelo – 1ª acqua (temperat. 13° C)	6	19	25	25
	Ponte S. Angelo - 2ª acqua discretamente torbida (temp. 12°. 5 C)	97	546	643	643

TABELLA 31.

DATA	Luogo di presa del campione	Numero delle colonie al 6° giorno dalla semina		Totale dei batteri	Media dei batteri per centim. cubo
		Fondenti	Non fondenti		
1° agosto 1900	Lungo Tevere 56 (Prima, temp. 14° C)	6	21	27	27
	Lungo Tevere 56 (Dopo, temp. 12° C - acqua discretamente torbida)	120	2,800	2,920	2,920
	Lungara 32 (Prima).	8	16	24	24
	Lungara 32 (Dopo – Acqua molto torbida)	1,600	18,000	19,600	19,600

TABELLA

LUOGO DI PROVENIENZA del campione	Caratteri del campione prelevato			Colonie a zooglee
	Aspetto del deposito	°/o di deposito in volume	°/o di deposito in peso	
Via Emanuele Filiberto, n. 2 (fontanella del cortile, a getto continuo - acqua torbida)	Deposito polveroso, giallastro come quello della Botte della 2ª Sereña	10 °/o	0,1906	0
Via S. Giovanni in Laterano, n. 72 (sbocco chiuso dal 2 ottobre 1902 - acqua torbida)	Idem	10 °/o	0,3640	0
Via S. Giovanni Decollato, num. 16 (sbocco chiuso - acqua limpida)	Appena qualche particella in sospensione	..	..	0
Idem (fontanella)	Acqua limpida	..	..	0
Via Luigi Santini (fontanella a getto continuo)	Idem	..	..	..
Idem (acqua torbida).	Poco deposito granuloso grossolano	5 °/o	0,6650	1 (B. coeruleum)
Via dei Gracchi (fontanella). . . .	..	..	..	0
Via dei Gracchi, n. 29 (sbocco chiuso - acqua torbida)	Color nero, poi verdastro, poi marrone	20 °/o	0,1894	1 (B. coeruleum)
Via ripetta, num. 69 (sbocco chiuso - acqua torbida)	Color giallo-ocra	20 °/o	0,5540	0
Borgo S. Spirito, n. 72 (sbocco a getto continuo - acqua torbida)	Poco deposito grossolano	2,5 °/o	0,1269	0
Borgo S. Spirito (fontanella). . . .	Acqua limpida	..	..	0
Piazza Pasquino (sbocco a getto continuo)	Idem	..	..	0

Numero delle colonie sviluppatesi						
Patine	Fluidificanti		Non fluidificanti		Numero totale dei microrganismi per cmc.	Osservazioni
	non cromogeni	cromogeni	non cromogeni	cromogeni		
(B. fluor. liquef.)	4,620	283	3,000	160	8,063	Le semine furono fatte in gelatina ed in agar; però per il grande sviluppo dei fluidificanti nelle piastre in gelatina, la conta si fece dalle piastre in agar tenute alla temperatura di 25°-30° C e dopo 7 giorni dalla semina. Il numero dei fluidificanti si dedusse dal numero delle colonie simili dei germi dopo la loro identificazione.
0	80	160	20	0	260	
0	160	100	240	20	520	
(B. fluor. liquef.)	9	6	2	0	18	
0	63	11	9	1	85	
0	0	40	520,000	40	520,080	
0	31	2	1	24	58	
B. fluor. liquef. B. viscosus B. mycoides B. subtilis	1,282	1,842	0	0	3,125	
1 (B. mycoides)	481	0	60	120	661	
0	400	80	0	0	480	
0	4	1	7	1	13	
0	1	2	8	0	11	

TABELLA 33. — *Serbatoio dell'Istituto d'igiene.*

DATA	Luogo di presa	Totale dei batteri	Media dei batteri per centimetro cubo	
			Luogo di presa	Numero dei batteri
1902				
Maggio . . .	Arrivo dell'acqua .	6		
» . . .	» » . .	10		
» . . .	» » . .	7	Arrivo dell'acqua . .	8
» . . .	Superficie » . .	1		
» . . .	» » . .	1		
» . . .	» » .	11	Superficie » . .	5
» . . .	Profondità » . .	45		
» . . .	» » .	2	Profondità » . .	24
» . . .	Sabbia del fondo . .	2,842		
» . . .	» » . .	1,036		
» . . .	» » . .	1,434		
» . . .	» » . .	3,028		
» . . .	» » . .	10,976		
» . . .	» » . .	952	Sabbia del fondo . .	3,312

TABELLA 34. — *Stazione di S. Onofrio di campagna* (*Sbocco n° 19689*).

DATA		Numero delle colonie al 7° giorno dalla semina	Media dei batteri per centimetro cubo
5 luglio 1902	Acqua limpida	16	
	» »	7	
	» »	56	
	» »	1	
	» »	25	Acqua limpida . 21
	» 1ª sporca	586	» 1ª sporca 586
	» 2ª »	∞ (Dopo 2 giorni dalla semina)	» 2ª » ∞
	» 3ª »	∞ (Dopo 2 giorni dalla semina)	» 3ª » ∞
	» torbida	∞ (Dopo 2 giorni dalla semina)	
	» »	∞ (Dopo 2 giorni dalla semina)	» torbida ∞

TABELLA 35. — *Centro di distribuzione « Fate bene fratelli »* (*sulla via Portuense*).

DATA		Numero delle colonie al 7° giorno dalla semina	Media dei batteri per centimetro cubo
8 luglio 1902	Acqua limpida	24	
	» »	32	28

TABELLA 36. — *Proprietà Ceccarelli* (*fuori Porta Portese*).

DATA		Numero delle colonie al 7° giorno dalla semina	Media dei batteri per centimetro cubo
8 luglio 1902	Acqua limpida	14	
	» »	15	
	» »	27	Acqua limpida : 19
	» sporca	204	
	» »	150	» sporca : 177

TABELLA 37. — *Località « Pontefratta » (fuori Porta S. Paolo).*

DATA	Luogo di presa	Numero delle colonie dopo 14 giorni dalla semina	Media dei batteri per centim. cubo
9 luglio 1902	Sbocco n. 24,583 (bocchetta della Villa - acqua limpida - temperatura 23° C)	43	
	Sbocco n. 24,583 (bocchetta della Villa - acqua limpida - temperatura 23° C)	31	Sbocco n. 24,583 : 37
	1° Centro di distribuzione (acqua sporca - temperatura 18°. 5 C)	191	1° Centro di distribuzione : 191
	2° Centro di distribuzione (acqua sporca - temperatura 18°. 5 C)	224	2° Centro di distribuzione : 224

TABELLA 38. — *Fiumicino.*

DATA	Luogo di presa	Temperatura dell'acqua	Media dei batteri per centim. cubo
8 luglio 1902	Colonnetta n. 1 (fontanella pubblica)	19°. 5 C.	8
	Colonnetta n. 2 (fontanella pubblica)	20°. 2 C.	42
	Cassetta idrometrica o cassettino d'arrivo dell'acqua	20°. 2 C.	6
	Serbatoio (acqua di deposito). . .	22°. 0 C.	87

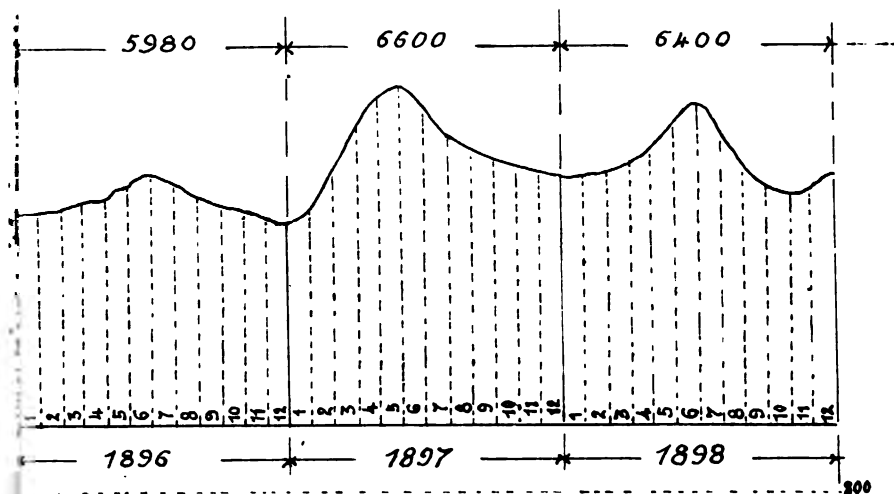
CELLI — CASAGRANDI — BAIARDI
Batteriologia dell'Acqua Marcia

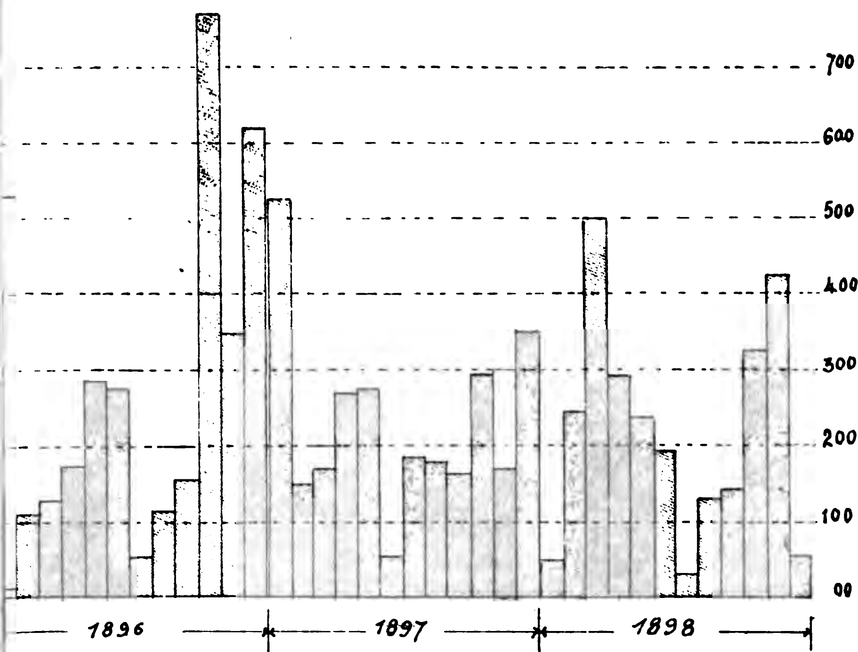
CARTA
DROGRAFICO-LITOLOGICA

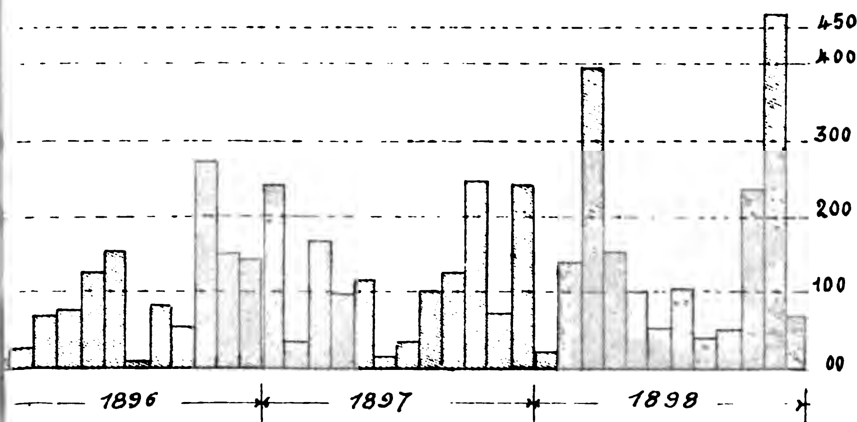
58

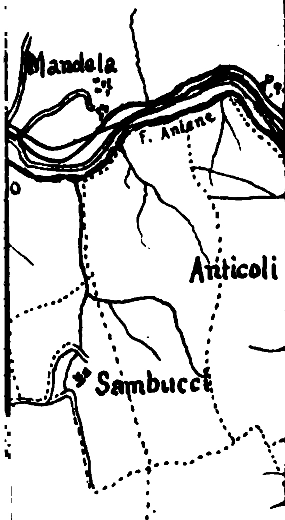


Batteriologia dell' Acqua Marcia.








Mandela
F. Aniene
Anticoli
Sambucci



58



